

任敏华, 张静燕, 崔晓东, 等. 赣南地区番茄青枯菌菌系多样性分析 [J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(1): 67-76.  
REN Minhua, ZHANG Jingyan, CUI Xiaodong, et al. Diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from tomato in the south of Jiangxi Province[J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(1): 67-76.

# 赣南地区番茄青枯菌菌系多样性分析

任敏华<sup>1</sup>, 张静燕<sup>2</sup>, 崔晓东<sup>1</sup>, 陈荣华<sup>2</sup>, 刘琼光<sup>1,3</sup>

(1 华南农业大学 植物保护学院, 广东 广州 510642; 2 赣州市农业科学研究所, 江西 赣州 341000;

3 广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室, 广东 广州 510642)

**摘要:**【目的】分离鉴定赣南地区番茄青枯病菌, 明确菌系分化, 为当地番茄抗青枯病育种和病害防治奠定基础。【方法】从江西省赣南地区采集番茄青枯病病株, 经选择性平板分离、纯化和分子鉴定, 获得不同地理来源的青枯菌 *Ralstonia solanacearum* 菌株。通过生理生化测定和接种番茄试验, 鉴定青枯菌的生化变种和致病类型。PCR 扩增内切葡聚糖酶基因 *egl* 序列, 明确青枯菌的演化型和序列变种。双层平板培养法测定其对 8 个不同噬菌体的敏感性。【结果】获得了来自赣南地区 9 个市(县)的番茄青枯菌菌株 44 个, 其中, 41 个菌株为生化变种 III, 3 个菌株为生化变种 IV; 致病力测定结果聚为 I、II 和 III 类, 其致病力分别为强、中和弱, 其中, 强致病力菌株占 65.9%。所有菌株属于亚洲分支演化型 (I), 并进一步划分为 Sequevar13、14、15、17、18、34、44 和 48 等 8 个序列变种。大部分菌株对供试的 8 个噬菌体敏感。【结论】赣南地区番茄青枯菌以生化变种 III 和强致病力菌株为主, 对噬菌体较敏感, 存在 8 个序列变种, 具有明显的菌系分化现象和遗传多样性。

**关键词:** 茄科雷尔氏菌; 番茄青枯病; 生化变种; 致病力; 演化型; 序列变种; 噬菌体

中图分类号: S436.412.1<sup>+</sup>5

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2022)01-0067-10

## Diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from tomato in the south of Jiangxi Province

REN Minhua<sup>1</sup>, ZHANG Jingyan<sup>2</sup>, CUI Xiaodong<sup>1</sup>, CHEN Ronghua<sup>2</sup>, LIU Qiongguang<sup>1,3</sup>

(1 College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Institute of

Agricultural Sciences in Ganzhou, Ganzhou 341000, China; 3 Key Laboratory of Microbial Signals and

Crop Disease Control of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** 【Objective】 Isolating and identifying *Ralstonia solanacearum* strains from tomato plants in the Southern of Jiangxi Province, and clarifying the bacterial differentiation can lay the foundation for local tomato bacterial wilt resistance breeding and disease control. 【Method】 The diseased tomato plants were collected from the south of Jiangxi Province, *R. solanacearum* strains with different geographical origins were isolated by selective plate, purified and identified by PCR. The test of physiology and biochemistry and inoculation on tomato plants were conducted for the determination of biovar and virulence difference. The endoglucanase gene (*egl*) fragments were amplified by PCR to determine the phylotype and sequevar of *R. solanacearum*. 【Result】 A total of 44 *R. solanacearum* strains were obtained from nine cities (counties) in the south of Jiangxi

收稿日期: 2021-01-25 网络首发时间: 2021-06-15 11:08:45

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20210611.1534.002.html>

作者简介: 任敏华, 硕士研究生, 主要从事植物细菌病害研究, E-mail: [renmishka@163.com](mailto:renmishka@163.com); 通信作者: 陈荣华, 研究员, 主要从事农作物病害研究, E-mail: [Chenronghua009@163.com](mailto:Chenronghua009@163.com); 刘琼光, 副教授, 博士, 主要从事植物细菌病害研究, E-mail: [qgliu@scau.edu.cn](mailto:qgliu@scau.edu.cn)

基金项目: 江西省赣州市科技项目(赣市财教字[2019]号)

Province, among which 41 strains were identified as biovar III and three strains were identified as biovar IV. According to the results of virulence difference, 44 strains were clustered into three groups, namely group I (high virulence), group II (moderate virulence) and group III (weak virulence), of which group I (high virulence) strains accounted for 65.9%. All strains were belonged to the phylotype I and further divided into eight sequevars, namely Sequevar 13, 14, 15, 17, 18, 34, 44 and 48 respectively. Most *R. solanacearum* strains were sensitive to the eight tested bacteriophages. 【Conclusion】 The strains of *R. solanacearum* from tomato in the south of Jiangxi Province are mainly biovar III and high virulence, sensitive to bacteriophages, have eight sequevars, and have obvious differentiation and genetic diversity.

**Key words:** *Ralstonia solanacearum*; Tomato bacterial wilt; Biovar; Virulence; Phylotype; Sequevar; Bacteriophage

茄科雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 俗称青枯菌, 是危害严重的世界性植物病原细菌<sup>[1]</sup>, 广泛分布于热带、亚热带、温带地区, 寄主范围极广<sup>[2]</sup>。青枯菌侵染番茄引起的番茄青枯病, 在我国南方番茄产区普遍发生且危害严重<sup>[3-4]</sup>。

青枯菌具有高度变异性及适应性, 菌系分化明显, 不同菌株间基因组变异性较强。明确不同来源青枯菌的致病力分化, 探索青枯菌的种内遗传多样性, 具有重要意义。关于青枯菌的种下分类, Hayward 等<sup>[5]</sup>、华静月等<sup>[6]</sup>根据 3 种双糖和 3 种己醇的利用能力不同, 划分出 5 个生化变种或生化型。Prior 等<sup>[7]</sup>根据地理起源的密切相关性, 将青枯菌分为 4 个演化型, 即亚洲分支演化型 (I)、美洲分支演化型 (II)、非洲分支演化型 (III) 和印度尼西亚分支演化型 (IV), 而在演化型内根据内切葡聚糖酶 (Endoglucanase) 基因 *egl* 序列的差异, 又细分为多个序列变种 (Sequevar)。目前, 国际上已经鉴定出 51 个序列变种, 来自中国的青枯菌属于演化型 I 和 II, 以及 1、12、13、14、15、16、17、18、34、44 和 48 等 11 个序列变种<sup>[8]</sup>。尽管我国有些省份对番茄青枯病菌有研究报道<sup>[9]</sup>, 但来自江西省的番茄青枯菌菌系研究较少。

近年来, 在江西省赣南地区种植番茄、辣椒和茄子等茄科蔬菜面积扩大, 发展态势迅猛, 然而, 由于青枯病的严重危害, 给当地蔬菜生产造成了巨大的经济损失。目前, 番茄青枯病的防治尚无有效的防治药剂, 虽然有研究表明选择合适的噬菌体或噬菌体组合对作物青枯病具有较好的防治作用<sup>[10-12]</sup>, 但其应用仍受到许多限制。选育抗病或耐病品种是青枯病防治最经济有效的方法, 但由于青枯菌菌系分化明显, 且与寄主、环境之间构成复杂的互作关系, 使得生产上推广的抗病品种往往随着种植年限的延长、青枯菌菌系致病力的变化, 导致品种的抗

性丧失<sup>[13-15]</sup>, 因此, 抗病育种工作任务艰巨。分离赣南地区的番茄青枯菌菌株, 建立该地区青枯菌资源库, 明确青枯菌的生化变种、致病力、序列变种以及对噬菌体的敏感性, 将有助于解析青枯病的发生流行机理、指导番茄抗青枯病育种和制定相关的病害防治措施。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试培养基及噬菌体

固体培养基: 牛肉膏 3 g·L<sup>-1</sup>, 酵母膏 3 g·L<sup>-1</sup>, 蛋白胨 3 g·L<sup>-1</sup>, 硫酸镁 0.25 g·L<sup>-1</sup>, 磷酸氢二钾 2 g·L<sup>-1</sup>, 磷酸二氢钾 0.5 g·L<sup>-1</sup>, 蔗糖 15 g·L<sup>-1</sup>, 琼脂粉 18 g·L<sup>-1</sup>。

半固体培养基: 牛肉膏 3 g·L<sup>-1</sup>, 酵母膏 3 g·L<sup>-1</sup>, 蛋白胨 3 g·L<sup>-1</sup>, 硫酸镁 0.25 g·L<sup>-1</sup>, 磷酸氢二钾 2 g·L<sup>-1</sup>, 磷酸二氢钾 0.5 g·L<sup>-1</sup>, 蔗糖 15 g·L<sup>-1</sup>, 琼脂粉 8 g·L<sup>-1</sup>。

LB 液体培养基: 酵母提取物 5 g·L<sup>-1</sup>, 氯化钠 10 g·L<sup>-1</sup>, 胰蛋白胨 10 g·L<sup>-1</sup>。

生化变种鉴定基础培养基: 蛋白胨 1.0 g·L<sup>-1</sup>, 磷酸二氢胺 1.0 g·L<sup>-1</sup>, 氯化钾 0.2 g·L<sup>-1</sup>, 七水硫酸镁 0.2 g·L<sup>-1</sup>, 溴百里酚蓝指示剂 3.0 ml·L<sup>-1</sup>, pH 调至 7.0。

2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑 (TTC) 培养基: 水解干酪素 1 g·L<sup>-1</sup>, 蛋白胨 10 g·L<sup>-1</sup>, 甘油 5 mL·L<sup>-1</sup>, 琼脂粉 32 g·L<sup>-1</sup>, 使用前, 每 1 L 培养基加 5 mL 质量浓度为 10 g·L<sup>-1</sup> 的 TTC 溶液。

牛肉膏蛋白胨 (NA) 液体培养基: 牛肉浸膏 3 g·L<sup>-1</sup>, 葡萄糖 10 g·L<sup>-1</sup>, 蛋白胨 5 g·L<sup>-1</sup>, 酵母粉 0.5 g·L<sup>-1</sup>, pH 调至 7.0。

供试噬菌体: 编号分别为 P1556-1、P1556-2、P7-1、P574、P1521、P1555-L、P1555-1 和 P1555-M, 分离自江西、广东等地作物青枯病土壤, 由华南农业大学植物细菌研究室提供并保存。

### 1.2 青枯菌的分离纯化与保存

2019—2020 年, 在番茄青枯病发病高峰期间,

前往江西省赣南地区各市、县区采集番茄青枯病标本,用TTC选择性培养基分离青枯菌,30℃条件下培养24~48h,挑取青枯菌典型单菌落,在TTC平板上划线纯化,继代3次,获得纯化菌株。用青枯菌特异性引物759(5'-GTCGCCGTCACCTCACTTTCC-3')和760(5'-GTCGCCGTCAGCAATGCGGAATCG-3')<sup>[7]</sup>进行PCR鉴定,将扩增得到280bp特异目的片段的青枯菌菌株,-80℃甘油保存。同时,用细菌基因组DNA提取试剂盒,提取各菌株DNA,-20℃保存备用。

### 1.3 青枯菌生化变种测定

参照Hayward等<sup>[5]</sup>、华静月等<sup>[6]</sup>方法。分别将乳糖、甘露醇、山梨醇和甜醇加入基础培养基中,质量浓度均为10g·L<sup>-1</sup>,分装试管,每管4~5mL,110℃条件下灭菌20min。纤维二糖和麦芽糖经过滤灭菌后,分别加入灭菌的基础培养基中,质量浓度为10g·L<sup>-1</sup>。每个菌株每种化合物接种3支试管,以不接种青枯菌为对照,28℃条件下培养21d。

### 1.4 青枯菌致病性测定及数据处理

参照何自福等<sup>[16]</sup>的方法,选择对青枯病表现不同抗性的5个番茄品种,分别为红圣佳二号(抗

病)、金艳(中抗)、多宝(中抗)、粉霸(感病)和精棚T红(高感),作为致病性分化的鉴别品种。将健康番茄种子播于穴盘消毒基质中,待4~5片叶苗龄时用于接种。采用浸根接种方法,将番茄根部浸于1×10<sup>8</sup>CFU·mL<sup>-1</sup>青枯菌悬液中,15min后移栽到钵中,每盆种2株,以浸无菌水的植株为空白对照,每个菌株接种每个番茄品种20株,定期记录发病情况,接种后第45天,各处理病情稳定,统计发病率。采用离差平均和的系统聚类方法(即Ward聚类)对数据进行聚类分析。

### 1.5 *egl* 基因扩增和系统发育树构建

内源葡聚糖酶基因(*egl*基因)扩增引物:Endo-F(5'-ATGCATGCCGCTGGTCGCCGC-3')和Endo-R(5'-GCGTTGCCCGGCACGAACACC-3')。PCR扩增反应程序:96℃预变性9min;95℃变性1min,70℃退火1min,72℃延伸2min,30个循环;72℃延伸10min,扩增产物交由睿博兴科生物技术公司进行测序,将序列提交到GenBank数据库,并与相关序列进行比对(参考序列信息见表1)。用Clustalx和MEGA软件进行系统发育分析,采用Jukes and Cantor模型邻接法(Neighbor-joining,

表1 参考序列信息

Table 1 Referenced sequence information

参考菌株 Reference strain	寄主 Host	来源 Origin	演化型 Phylotype	序列变种 Sequevar	<i>egl</i> 登录号 Accession number
JT523	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	留尼汪岛 Reunion	I	13	AF295252
PSS8	番茄 <i>S. lycopersicum</i>	中国 China	I	14	FJ561066
PSS358	番茄 <i>S. lycopersicum</i>	中国 China	I	15	EU407298
UW151	姜 <i>Zingiber officinale</i>	澳大利亚 Australia	I	16	AF295254
P11	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	中国 China	I	17	FJ561068
GMI1000	番茄 <i>S. lycopersicum</i>	法国 France	I	18	AF295251
JT519	天竺葵 <i>Pelargonium hortorum</i>	留尼汪岛 Reunion	I	31	GU295032
PSS219	番茄 <i>S. lycopersicum</i>	中国 China	I	34	FJ561167
O3	橄榄树 <i>Olea europaea</i>	中国 China	I	44	FJ561069
TB28	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	中国 China	I	44	FJ561127
Tb43	烟草 <i>N. tabacum</i>	中国 China	I	44	FJ561129
BdII	木槿 <i>Hibiscus syriacus</i>	中国 China	I	44	FJ561098
CIIP365	马铃薯 <i>S. tuberosum</i>	菲律宾 The Philippines	I	45	GQ907151
MADI7	辣椒 <i>Capsicum annum</i>	马达加斯加 Madagascar	I	46	GU295040
GMI8254	番茄 <i>S. lycopersicum</i>	印度尼西亚 Indonesia	I	47	GU295014
M2	桑树 <i>Morus alba</i>	中国 China	I	48	FJ561067
CMR87	番茄 <i>S. lycopersicum</i>	喀麦隆 Cameroon	II	35	EF439727
CMR12	番茄 <i>S. lycopersicum</i>	喀麦隆 Cameroon	II	52	EF439725
CMR39	番茄 <i>S. lycopersicum</i>	喀麦隆 Cameroon	II	41	EF439726
CFBP2972	马铃薯 <i>S. tuberosum</i>	马提尼克 Martinique	II	35	EF371809
UW551	天竺葵 <i>P. hortorum</i>	肯尼亚 Kenya	II	1	DQ657596
ICMIP7963	马铃薯 <i>S. tuberosum</i>	肯尼亚 Kenya	II	7	AF295263

续表 1 Continued table 1

参考菌株 Reference strain	寄主 Host	来源 Origin	演化型 Phylotype	序列变种 Sequevar	egl 登录号 Accession number
UW162	香蕉 <i>Musa nana</i>	秘鲁 Peru	II	4	AF295256
MOLK2	香蕉 <i>M. nana</i>	菲律宾 The Philippines	II	3	EF371841
CMR66	木龙葵 <i>S. scabrum</i>	喀麦隆 Cameroon	III	49	EF439729
JT525	天竺葵 <i>P. hortorum</i>	留尼汪岛 Reunion	III	19	AF295272
CFBP3059	茄子 <i>S. melongena</i>	布基纳法索 Burkina Faso	III	23	AF295270
NCPPB332	马铃薯 <i>S. tuberosum</i>	津巴布韦 Zimbabwe	III	22	DQ657649
MAFF301558	马铃薯 <i>S. tuberosum</i>	日本 Japan	IV	8	AY465002
Psi	番茄 <i>S. lycopersicum</i>	印度尼西亚 Indonesia	IV	10	EF371804
ACH732	番茄 <i>S. lycopersicum</i>	澳大利亚 Australia	IV	11	GQ907150

NJ) 构建系统发育树, 1 000 次重复 Bootstrap 统计学检验后构建发育树。

### 1.6 噬菌体敏感性测定

**噬菌体培养:** 在 15 mL 的 LB 液体培养基中, 将青枯菌与噬菌体按照体积比 1:1 混匀, 在 30 °C、180 r·min<sup>-1</sup> 条件下培养过夜。

**双层平板制备:** 取青枯菌菌液 100 μL 加入 15 mL、50 °C 的半固体培养基, 迅速混匀倒入固体培养基平板上, 制成双层平板, 点接 3 μL 噬菌体液, 30 °C 条件下培养 24 h, 观察噬菌斑产生情况。根据青枯菌被侵染的噬菌体数量 ( $n$ /个) 判别青枯菌对噬菌体的敏感性, 标准:  $n \leq 2$ , 敏感性弱;  $3 \leq n \leq 5$ , 敏感性中等;  $6 \leq n \leq 7$ , 敏感性强;  $n \geq 8$ , 敏感性特强。

## 2 结果与分析

### 2.1 青枯菌的分离纯化

2019—2020 年, 在江西省赣南地区各市、县番茄种植地均有青枯病发生, 采集自于都、上犹、石城、瑞金等 9 个县 (市) 的番茄青枯病病株中, 共分离和鉴定出 44 个青枯菌株, 其中于都县 9 个, 上犹县 7 个, 石城县 4 个, 瑞金市 2 个, 大余县 3 个, 安远县 3 个, 会昌县 6 个, 兴国县 2 个, 全南县 8 个。

### 2.2 青枯菌的生化变种鉴定

根据对 6 种碳水化合物的利用情况 (表 2), 44 个番茄青枯菌可划分为生化变种 III 和 IV, 其中, 来自大余县的 3 个青枯菌菌株为生化变种 IV, 其余的 41 个青枯菌均为生化变种 III, 表明赣南地区番

表 2 青枯菌生化变种鉴定<sup>1)</sup>Table 2 Biovar identification of *Ralstonia solanacearum*

来源 Origin	菌株编号 No. of strain	菌株数/个 Strain quantity	麦芽糖 Maltose	纤维二糖 Cellobiose	乳糖 Lactose	甘露醇 Mannitol	山梨醇 Sorbitol	甜醇 Dulcitol	生化变种 Biovar
于都县 Yudu County	Tm1901~Tm1908、 Tm1920~Tm1924	9	+	+	+	+	+	+	III
上犹县 Shangyou County	Tm1913~Tm1919	7	+	+	+	+	+	+	III
石城县 Shicheng County	Tm1925~Tm1929	4	+	+	+	+	+	+	III
瑞金市 Ruijin City	Tm1930、Tm1931	2	+	+	+	+	+	+	III
大余县 Dayu County	Tm1932~Tm1934	3	-	-	-	+	+	+	IV
安远县 Anyuan County	Tm1935~Tm1937	3	+	+	+	+	+	+	III
会昌县 Huichang County	Tm1938~Tm1943	6	+	+	+	+	+	+	III
兴国县 Xingguo County	Tm2046、Tm2047	2	+	+	+	+	+	+	III
全南县 Quannan County	Tm1944、Tm1945、 Tm2048~Tm2058	8	+	+	+	+	+	+	III

1) “+” 表示被利用, “-” 表示不被利用

1) “+” indicates to be used, “-” indicates not to be used

茄青枯菌以生化变种III为主。

宝(中抗)、粉霸(感病)、精棚 T 红(高感)5 个抗性程度不同的番茄品种, 结果表明, 44 个菌株在不同的番茄品种上的致病力存在明显差异(表 3)。

### 2.3 青枯菌的致病力测定

青枯菌接种红圣佳二号(抗病)、金艳(中抗)、多

表 3 44 个青枯菌接种 5 个番茄品种的发病率及聚类分组

Table 3 Incidence of 44 *Ralstonia solanacearum* strains inoculated to five tomato cultivars and their clustering results

来源 Origin	菌株编号 No. of strain	发病率/% Incidence rate					聚类分组 Cluster
		红圣佳2号 Hongshengjia 2	金艳 Jinyan	多宝 Duobao	粉霸 Fenba	精棚T红 Jingpeng T red	
于都县 Yudu County	Tm1901	55	80	95	100	95	II
	Tm1902	90	85	75	100	100	I
	Tm1903	85	80	95	100	100	I
	Tm1904	90	95	70	100	100	I
	Tm1907	85	75	80	100	100	I
	Tm1908	37	65	60	72	90	III
上犹县 Shangyou County	Tm1913	90	70	90	100	90	I
	Tm1914	95	75	85	95	100	I
	Tm1915	85	75	95	90	100	I
	Tm1916	60	75	90	85	95	II
	Tm1917	40	70	85	90	100	II
	Tm1918	50	70	95	90	100	II
	Tm1919	0	5	15	40	65	III
于都县 Yudu County	Tm1920	80	85	80	90	90	I
	Tm1923	50	80	95	68	95	II
	Tm1924	80	95	85	85	100	I
石城县 Shicheng County	Tm1925	65	85	85	95	85	II
	Tm1926	95	100	90	100	100	I
	Tm1928	80	75	100	95	100	I
	Tm1929	35	21	40	50	95	III
瑞金市 Ruijin City	Tm1930	90	95	95	100	100	I
	Tm1931	100	100	100	100	100	I
大余县 Dayu County	Tm1932	20	35	65	45	80	III
	Tm1933	35	35	55	80	90	III
	Tm1934	20	40	75	60	100	III
安远县 Anyuan County	Tm1935	40	52	85	95	100	III
	Tm1936	30	35	90	80	89	III
	Tm1937	85	95	90	100	95	I
会昌县 Huichang County	Tm1938	90	85	95	100	100	I
	Tm1939	80	85	95	100	95	I
	Tm1940	85	90	100	95	100	I
	Tm1941	100	84	100	100	100	I
	Tm1942	95	100	100	100	95	I
	Tm1943	40	85	95	90	100	II
全南县 Quannan County	Tm1944	100	100	95	100	100	I
	Tm1945	100	90	100	90	100	I
兴国县 Xingguo County	Tm2046	100	100	100	100	100	I
	Tm2047	100	100	100	100	100	I
全南县 Quannan County	Tm2048	100	95	100	100	89	I
	Tm2049	100	95	100	100	90	I
	Tm2050	100	95	100	100	100	I
	Tm2054	100	100	100	100	100	I
	Tm2055	100	95	100	100	100	I
	Tm2058	90	90	100	100	100	I



采用系统聚类中的离差平均和的聚类方法(即 Ward 聚类),对 44 个菌株接种 5 个番茄品种的青枯病发病率结果进行聚类分析,明确青枯菌之间的致病力差异。采用离差平均和方法,样本间的距离采用欧氏距离,该距离数值的大小反映样本之间的相似度,数值越小,2 个样本之间的相似度越高,数值越大,则相似度越低。本研究以欧氏距离 1.2 为参考标准,将 44 个青枯菌聚为 3 个组(图 1)。第 I 组共有 29 个菌株,分别来自除大余县外的 8 个县(市);第 II 组的 7 个菌株分离自于都、上犹、石城、会昌 4 个县,该组致病力为中等强度;第 III 组的 8 个菌株分离自于都、上犹、石城、大余、安远 5 个县,致病力弱,其中来自上犹县的 Tm1919 致病力最弱。上述结果表明,赣南地区番茄青枯菌致病力分化现象明显,在于都、上犹和石城县均存在致病力强、

中、弱 3 种类型的菌株,但总体来看,赣南地区番茄青枯菌以致病较强的菌株占优势。

#### 2.4 青枯菌序列变种及系统发育分析

44 个青枯菌的 *egl* 基因片段序列与标准参考菌株进行比对,构建系统发育树(图 2)。结果表明,江西省赣南地区的番茄青枯菌属于亚洲分支、演化型 I(Phylotype I)的 8 个序列变种(Sequevar)。其中 Tm1929、Tm1935 和 Tm1937 与马铃薯青枯菌 JT523(留尼汪岛)属于 Sequevar 13; Tm1908、Tm1920、Tm1923、Tm1924、Tm1930、Tm1931、Tm1933、Tm1934、Tm1940~Tm1943、Tm2046、Tm2054 共 14 个菌株与来自中国的番茄青枯菌 PSS8 属于 Sequevar 14; Tm1925、Tm1928、Tm1932、Tm2055 和 Tm2058 与来自中国的番茄青枯菌 PSS358 属于 Sequevar 15; Tm1913~Tm1919、

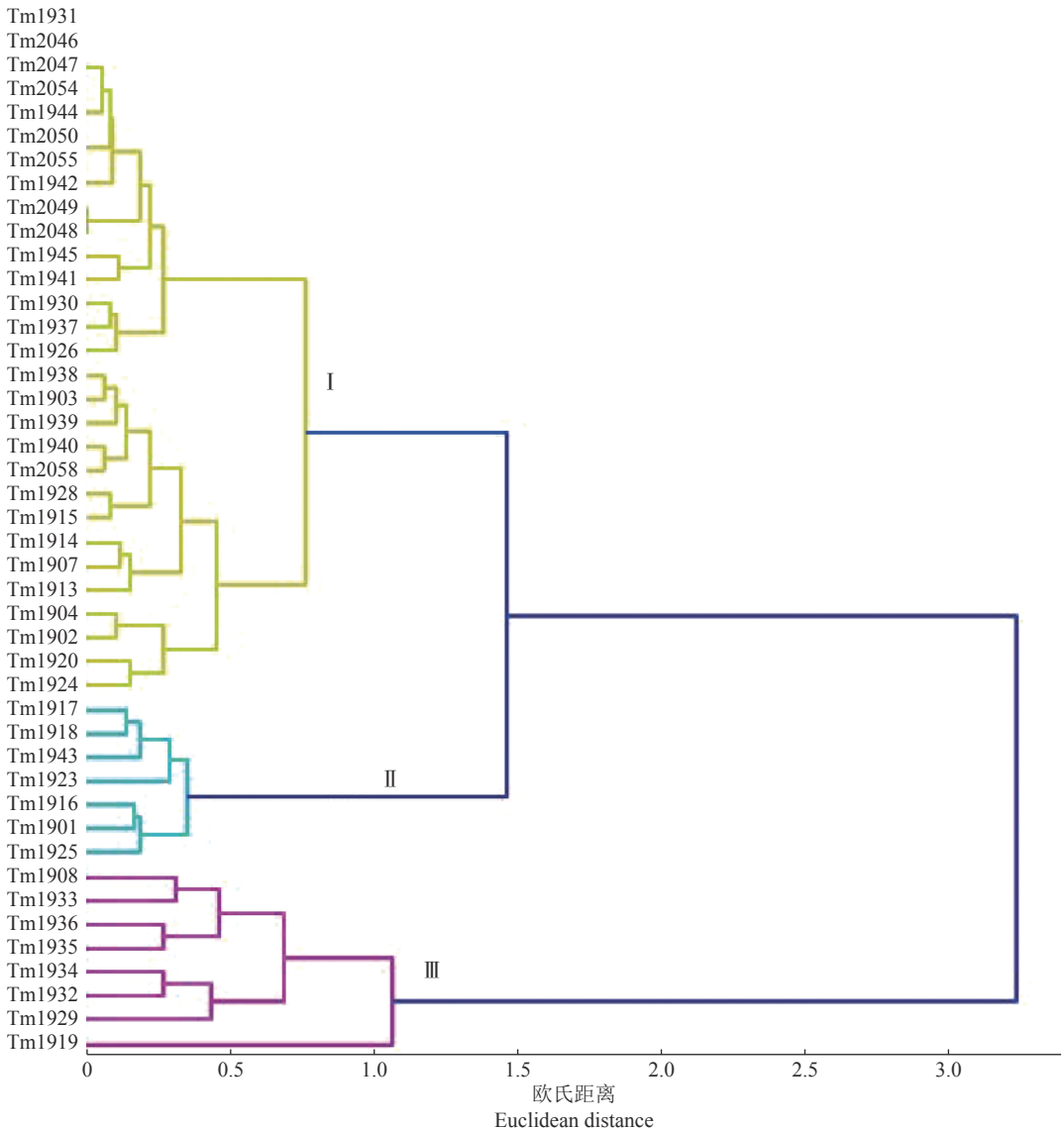
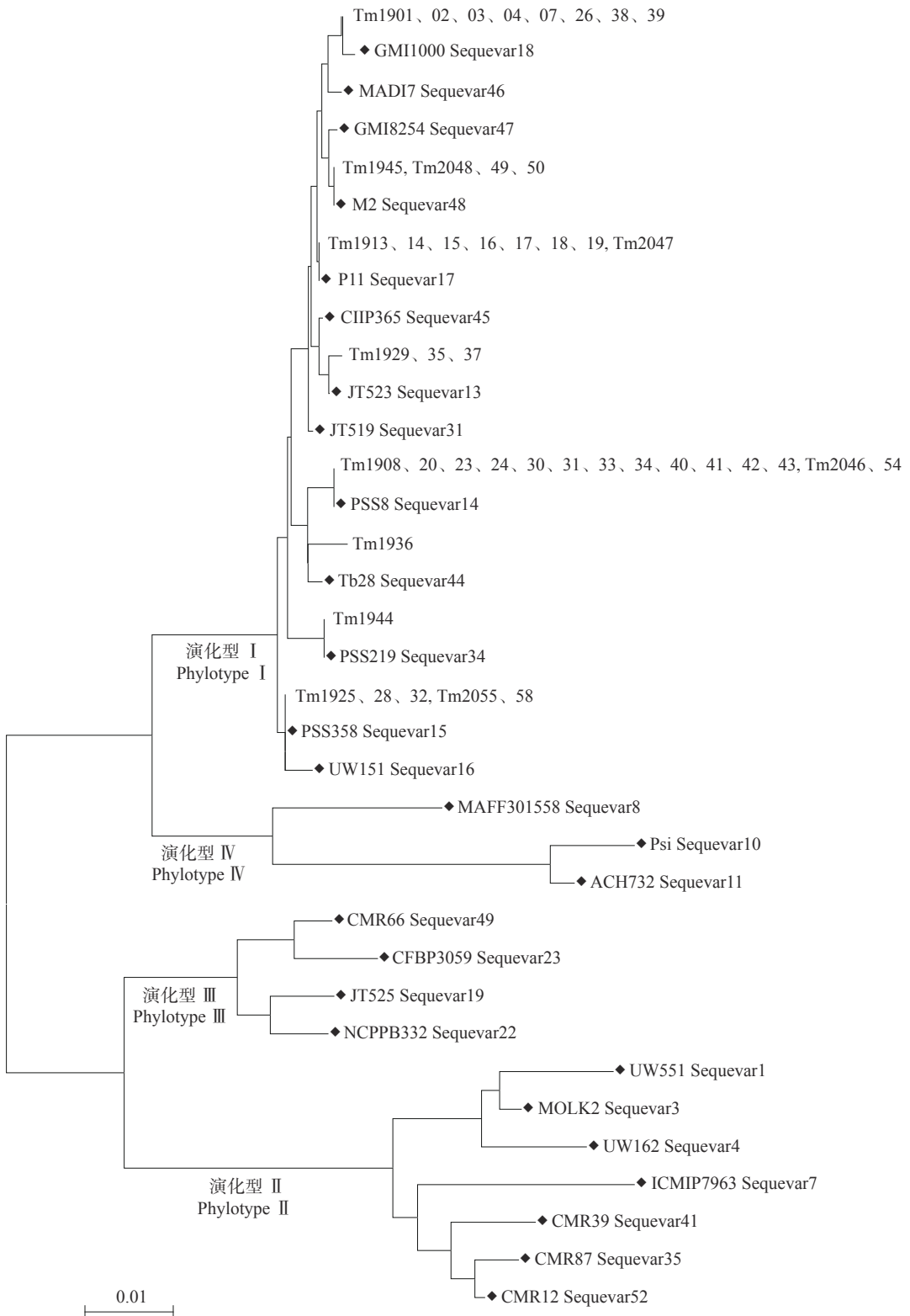


图 1 基于 44 个青枯菌接种 5 个番茄品种发病率的聚类分析结果

Fig. 1 Clustering results based on the incidence of 44 *Ralstonia solanacearum* strains inoculated to five tomato cultivars



将序列变种相同的菌株置于同一水平分支上, “◆”代表参考菌株  
 Strains with the same sequevar are settled at the same branch, “◆” indicates reference strain

图 2 基于青枯菌 *egl* 基因序列的系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis based on sequence of *egl* gene of *Ralstonia solanacearum*

Tm2047 共 8 个菌株与来自中国的花生青枯菌 P11 属于 Sequevar 17; Tm1901~Tm1904, Tm1907、Tm1926、Tm1938、Tm1939 共 8 个菌株与来自法国的番茄青枯菌 GMI1000 均为 Sequevar 18; Tm1944

与来自中国台湾的番茄青枯菌 PSS219 为 Sequevar 34; Tm1936 与来自中国的烟草青枯菌 Tb28 为 Sequevar 44; Tm1945、Tm2048~Tm2050 共 4 个菌株与来自中国的桑青枯菌 M2 同为 Sequevar 48。

## 2.5 青枯菌序列变种 (Sequevar) 的地理分布

在所分离的 44 个番茄青枯菌中, Sequevar 14 共有 14 个菌株, 分布于于都、瑞金、大余、会昌、兴国、全南 6 个县(市); Sequevar 18 有 8 个菌株, 分布于会昌、石城、于都 3 个县; Sequevar 17 有 8 个菌株, 其中 7 个分布于上犹县, 1 个来自兴国县; Sequevar 15 有 5 个菌株, 来自于石城、大余、全南 3 个县; Sequevar 48 的 4 个菌株, 全部来自全南县; Sequevar 13 有 3 个菌株, 分布于石城和安远县; Sequevar 34 和 Sequevar 44 各有 1 个菌株, 分别来

自全南和安远县。上述结果表明, 赣南地区番茄青枯菌序列变种存在丰富的多样性。

## 2.6 青枯菌对噬菌体的敏感性测定

双层平板法检测 8 个噬菌体裂解青枯菌的试验结果 (表 4) 表明, 44 个番茄青枯菌中, 只有菌株 Tm2047 对噬菌体的敏感性弱, 有 12 个菌株对噬菌体的敏感性表现为中等, 有 4 个菌株对噬菌体的敏感性较强, 另有 27 个菌株都能被 8 个噬菌体裂解, 其敏感性表现为特强。上述结果表明, 赣南地区番茄青枯菌对噬菌体普遍表现敏感。

表 4 44 个青枯菌对 8 个噬菌体的敏感性测定

Table 4 Sensitivity determination of 44 *Ralstonia solanacearum* to eight bacteriophages

来源 Origin	菌株编号 No. of strain	数量/个 Quantity	噬菌体 <sup>1)</sup> Bacteriophage								敏感性 <sup>2)</sup> Sensitivity
			P1555-L	P1555-1	P1555-M	P1556-1	P1556-2	P7-1	P574	P1521	
于都县 Yudu County	Tm1901~Tm1907	5	-	-	-	+	+	+	-	+	M
	Tm1908	1	+	+	+	+	+	+	+	+	V
上犹县 Shangyou County	Tm1913、Tm1914	2	+	+	+	+	-	+	+	+	S
	Tm1915~Tm1919	4	+	+	+	+	+	+	+	+	V
	Tm1916	1	+	+	+	+	-	+	+	+	S
于都县 Yudu County	Tm1920~Tm1924	3	+	+	+	+	+	+	+	+	V
石城县 Shicheng County	Tm1925~Tm1929	3	+	+	+	+	+	+	+	+	V
	Tm1928	1	+	+	+	+	-	+	+	+	S
瑞金市 Ruijin City	Tm1930、Tm1931	2	+	+	+	+	+	+	+	+	V
大余县 Dayu County	Tm1932~Tm1934	3	+	+	+	+	+	+	+	+	V
安远县 Anyuan County	Tm1935~Tm1937	3	+	+	+	+	+	+	+	+	V
会昌县 Huichang County	Tm1938、Tm1939	2	-	-	-	+	+	+	-	+	M
	Tm1940~Tm1943	4	+	+	+	+	+	+	+	+	V
全南县 Quannan County	Tm1944	1	-	-	-	+	+	+	+	+	M
	Tm1945	1	-	-	-	-	-	+	+	+	M
兴国县 Xingguo County	Tm2046	1	+	+	+	+	+	+	+	+	V
	Tm2047	1	-	-	-	+	-	+	-	-	W
全南县 Quannan County	Tm2048、Tm2049	2	-	-	-	+	+	+	+	+	M
	Tm2050	1	-	-	-	-	+	+	+	+	M
	Tm2054~Tm2058	3	+	+	+	+	+	+	+	+	V

1) “+”表示产生噬菌斑,“-”表示不产生噬菌斑;2)M:中等,S:强,V:特强,W:弱

1) “+” indicates having plaques, “-” indicates no having plaques; 2) M: Moderate, S: Strong, V: Very strong, W: Weak

## 3 讨论与结论

不同地理来源的青枯菌在与寄主长期协同进化的过程中, 演化出明显的生理分化型或菌系多样性。国外报道, 番茄青枯菌属于 1 号生理小种, 分为

演化型 I、II、III 和 IV<sup>[17-18]</sup>, 生化变种 I、II、III 和 IV<sup>[19-20]</sup>, 存在 Sequevar 1、4、5、6、7、8、9、10、11、13、14、15、18、20、29、31、35、41、38、39、46、52 等 22 个序列变种<sup>[21-23]</sup>。在我国, 已报道的番茄青枯菌属于 1 号生理小种、演化型 I, 分为生化变种 II、III 和



IV, 存在 Sequevar 13、14、15、16、17、18、34、44、48 和 54 等 10 个序列变种<sup>[24-25]</sup>。曾宪铭等<sup>[26]</sup>曾测定广东省 13 种农作物上的 129 个青枯菌, 其生化变种鉴定为 I、II、III、IV 及其亚型, 其中番茄青枯菌为生化变种 III 和 IV, 郑向华等<sup>[27]</sup>也获得类似的研究结果, 将番茄青枯菌鉴定为生化变种 III。2009 年, Xu 等<sup>[28]</sup>基于演化型分类框架, 对来自我国 13 个省、17 种不同寄主植物上的 286 株青枯菌进行多样性分析, 明确了我国青枯病菌具有丰富的遗传多样性, 其中番茄青枯菌属于演化型 I, 并有 Sequevar 13、14、15、16、17、18、44 等 7 个序列变种。2011 年, Xue 等<sup>[24]</sup>分析了我国 15 个省、14 种寄主植物上的 319 株青枯菌, 基于 PCR 指纹图谱及演化型框架, 将其中的番茄青枯菌鉴定为演化型 I, 存在 Sequevar 13、14、15、17、18、34、44、48 等 8 个序列变种。

本研究对江西省赣南地区的番茄青枯菌进行了分离和菌系分析, 结果显示, 在分离鉴定出的 44 个青枯菌中, 有 41 个菌株为生化变种 III (占 93.2%), 另有 3 个菌株属于生化变种 IV, 不存在生化变种 I 和 II, 与国内报道的番茄青枯菌生化变种结果基本相似。尽管我国的番茄青枯菌均属于 1 号生理小种, 但菌株之间致病力存在差异。本研究通过接种试验, 根据在 5 个不同青枯病抗性的番茄品种上的发病情况, 将来自赣南地区的番茄青枯菌分为 I、II、III 共 3 个致病类型, 而且致病力较强的菌株占 65.91%, 15.91% 的菌株致病力中等, 18.18% 的菌株致病力较弱, 可见, 赣南地区番茄青枯菌的致病力存在明显差异, 而且致病力较强的菌株是本地区的优势菌群, 这将为赣南地区的番茄抗青枯病育种工作提供指导。演化型和 *egl* 基因序列分析结果表明, 44 个番茄青枯菌株均属于演化型 I, 符合亚洲起源的演化型 I 分类框架<sup>[7]</sup>, 进一步研究显示, 赣南地区番茄青枯菌存在 8 个序列变种, 分别为 Sequevar 13、14、15、17、18、34、44 和 48, 未发现 Sequevar 16, 其中 Sequevar 14 (占 31.8%) 在本地区的番茄主要种植地区均有分布, 表明赣南地区番茄青枯菌存在丰富的遗传多样性。

噬菌体是侵染细菌的病毒, 具有高度的特异性及快速裂解宿主 (寄主) 的能力, 可用于植物细菌病害的防治<sup>[29-31]</sup>。有研究表明, 通过使用噬菌体组合的方法, 能够显著降低青枯菌数量, 对番茄青枯病具有较好的防治效果<sup>[32]</sup>。而测定青枯菌对噬菌体的敏感性, 可为利用噬菌体防治植物青枯病提供参考。本研究结果表明, 在 44 个青枯菌中, 有 61.36%

的青枯菌对供试的 8 个噬菌体敏感, 即都能被 8 个噬菌体裂解, 表明赣南地区番茄青枯菌对噬菌体普遍表现敏感。然而, 仍有 12 个菌株对 8 个噬菌体的综合敏感性表现为中等, 而 Tm2047 菌株对噬菌体不敏感。由此可见, 生产上应根据本地区青枯菌菌系的多样性及对噬菌体的敏感性, 有选择性地对噬菌体组合, 以减轻番茄青枯病的发生危害。

#### 参考文献:

- [1] 冯洁. 植物病原细菌分类最新进展[J]. *中国农业科学*, 2017, 50(12): 2305-2314.
- [2] HAYWARD A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1991, 29(1): 65-87.
- [3] 乔俊卿, 陈志谊, 刘邮洲, 等. 茄科作物青枯病研究进展[J]. *植物病理学报*, 2013, 43(1): 1-10.
- [4] 王杰, 龙世芳, 王正文, 等. 番茄青枯病防治研究进展[J]. *中国蔬菜*, 2020, 40(1): 22-30.
- [5] HAYWARD A. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1964, 27(2): 265-277.
- [6] 华静月, 张长龄, 何礼远. 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.
- [7] PRIOR P, FEGAN M. Recent development in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*[J]. *Acta Horticulturae*, 2005, 695(14): 127-136.
- [8] 徐进, 冯洁. 植物青枯菌遗传多样性及致病基因组学研究进展[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(14): 2902-2909.
- [9] JIANG G, WEI Z, XU J, et al. Bacterial wilt in China: History, current status, and future perspectives[J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1549. [2021-01-18]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01549>.
- [10] ADDY H S, ASKORA A, KAWASAKI T, et al. Loss of virulence of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* through infection by  $\phi$ RSM filamentous phages[J]. *Phytopathology*, 2012, 102(5): 469-477.
- [11] ADDY H S, ASKORA A, KAWASAKI T, et al. The filamentous phage  $\phi$ RSS1 enhances virulence of phytopathogenic *Ralstonia solanacearum* on tomato[J]. *Phytopathology*, 2012, 102(3): 244-251.
- [12] LIU N, LEWIS C, ZHENG W, et al. Phage cocktail therapy: Multiple ways to suppress pathogenicity[J]. *Trends in Plant Science*, 2020, 25(4): 315-317.
- [13] 余小漫, 何自福. 作物青枯病研究进展[J]. *广东农业科学*, 2020, 47(12): 82-89.
- [14] 汪国平, 林明宝, 吴定华. 番茄青枯病抗性遗传研究进展[J]. *园艺学报*, 2004, 31(3): 403-407.
- [15] 陈胜华. 番茄青枯病生物防治策略研究[J]. *农业与技术*, 2018, 38(6): 24.
- [16] 何自福, 虞皓, 罗方芳. 广东茄科青枯菌致病力分化及其 DNA 多态性分析[J]. *植物病理学报*, 2003, 33(5): 415-420.
- [17] WICKER E, GRASSART L, CORANSON-BEAUDU R,

- et al. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2007, 73(21): 6790-6801.
- [18] PEREZ A S, MEJIA L, FEGAN M, et al. Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection[J]. *Plant Pathology*, 2010, 57(2): 320-331.
- [19] NORMAN D J, ZAPATA M, GABRIEL D W, et al. Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America[J]. *Phytopathology*, 2009, 99(9): 1070-1077.
- [20] POUSSIER S, VANDEWALLE P, LUISETTI J. Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hrp* gene region[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(5): 2184-2194.
- [21] CHESNEAU T, MAIGNIEN G, BOYER C, et al. Sequence diversity and virulence of *Ralstonia solanacearum* phylotype I on Mayotte Island (Indian Ocean)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 2209. Doi: 10.3389/fpls.2017.02209.
- [22] JI P, ALLEN C, SANCHEZ-PEREZ A, et al. New diversity of *Ralstonia solanacearum* strains associated with vegetable and ornamental crops in Florida[J]. *Plant Disease*, 2007, 91(2): 195-203.
- [23] MAHBOU SOMO TOUKAN G, CELLIER G, WICKER E, et al. Broad diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon[J]. *Plant Disease*, 2009, 93(11): 1123-1130.
- [24] XUE Q Y, YIN Y N, YANG W, et al. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China assessed by PCR-based fingerprints to unravel host plant-and site-dependent distribution patterns[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 75(3): 507-519.
- [25] SHE X M, HE Z F, LI H P. Genetic structure and phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* strains from diverse origins in Guangdong Province, China[J]. *Journal of Phytopathology*, 2017, 166(3): 177-186.
- [26] 曾宪铭, 董春. 广东农作物青枯病菌的生化型[J]. 华南农业大学学报, 1995, 16(1): 50-53.
- [27] 郑向华, 杨帆, 邓海滨, 等. 我国植物青枯菌的生物型及 RAPD 分析[C]. //中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2008 年学术年会论文集. 广州: 中国农业科学技术出版社, 2008: 329-337.
- [28] XU J, PAN Z C, PRIOR P, et al. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2009, 125(4): 641-653.
- [29] 马超, 丛聪, 王丽丽, 等. 噬菌体控制植物细菌性疾病的研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2017, 42(9): 749-754.
- [30] DI LALLO G, EVANGELISTI M, MANCUSO F, et al. Isolation and partial characterization of bacteriophages infecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, causal agent of kiwifruit bacterial canker[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2015, 54(11): 1210-1221.
- [31] WEI C H, LIU J L, MAINA A, et al. Developing a bacteriophage cocktail for biocontrol of potato bacterial wilt[J]. *Virologica Sinica*, 2017, 32(6): 476-484.
- [32] WANG X F, WEI Z, YANG K M, et al. Phage combination therapies for bacterial wilt disease in tomato[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(12): 1513-1520.

【责任编辑 李晓卉】