

# 黑龙江省大豆细菌性疫病病原鉴定\*

李永镐 张原\*\* 张明厚

(东北农业大学 植保系)

## 摘 要

通过对供试的 15 个菌株致病性、形态、染色及生理生化特征的测定,确定黑龙江省大豆主要产区的细菌性病害是由丁香假单胞杆菌大豆致病变种 *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Coerper 1919) Yong, Dye & Wilkie, 1978 引起的大豆细菌性疫病。

**关键词** 大豆; *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*; 病原鉴定

黑龙江省大豆产区细菌性病害普遍发生,主要表现为叶片正面出现许多坏死斑点,周围有明显的褪绿圈,病斑背面呈水浸状,严重的可引起大豆叶片早期枯死,影响大豆的产量和品质。据报道,目前能够通过人工接种或自然侵染大豆的病原细菌有 8 个属,17 个种或致病变种<sup>[10]</sup>。国内报道有 2 个属中的 2 个致病变种引起大豆细菌性病害<sup>[3,4,6,7]</sup>。但对黑龙江省大豆病原细菌的研究未见报道。为了通过抗病育种,及其它措施,有效地控制细菌性病害的发生,作者对黑龙江省大豆病原细菌进行了系统鉴定。

## 材料及方法

### 一、细菌性病害发生情况调查及样本分离培养

1991—1993 年在九三、红兴隆、北安农场管局各农场、绥化市、克山县、及哈尔滨市香坊农场和东北农业大学校内的大豆试验田和生产田,调查了大豆细菌性病害发生情况。记载了种子和子叶发病百分率,并以复叶为单位调查了植株发病情况,计算病情指数。

复叶病情分级标准:

\* 本文于 1994 年 6 月 8 日收到。

This paper was received on June 8, 1994.

\*\* 现在黑龙江省植保植检站工作。

0 级:无症;

1 级:有 1—5 个病斑;

2 级:有 6—10 个病斑;

3 级:病斑面积占复叶面积的 10—20% 以下;

4 级:病斑面积占复叶面积的 20—40% 以下;

5 级:病斑面积占复叶面积的 40% 以上。

菌株的分离培养是在无菌条件下,剪下样本的病斑(约  $2 \times 2$  毫米),经表面消毒,无菌水冲洗 5 次,营养琼脂(NA)<sup>[5]</sup>培养基平板上划线,25℃ 温箱中培养。经单菌落纯化,得到分离物,转到 NA 斜面上培养,4℃ 冰箱中保存,每月转管 1 次。

## 二、致病性测定

将 NA 斜面上,25℃ 条件下,培养 48 小时的供试分离物,用无菌水稀释,采用血球计数板法,将细菌悬浮液调整到每毫升含  $10^8$  个菌体,用小型喷雾器喷洒到 1—2 片复叶完全展开的供试大豆植株(品种为 7913 和九丰 3 号)的叶片正面和背面。供试植株在接种前和接种后,分别保湿 48 小时。每分离物接种 5—6 株。试验在 15—27℃ 温室或网室内进行。接种后每天观察发病情况。

## 三、染色、形态及培养特征

革兰氏染色、荚膜染色、芽孢染色及培养特征观察参照常规方法<sup>[1]</sup>。形态及鞭毛观察用 pH6.5 的 2% 磷钨酸负染,电镜观察<sup>[5]</sup>。

## 四、烟草过敏性反应

将营养肉汤(NB)培养液<sup>[5]</sup>中,25℃ 条件下振荡培养 24 小时的供试菌株,用无菌水稀释到每毫升含  $10^8$  个菌体。用注射器将菌液注射到 6—7 片叶龄的烟草叶肉内。供试植株在 15—27℃ 温室培养 24 小时,观察记载。

## 五、生理生化特征测定

除柠檬酸盐的利用参照方中达(1977)植病研究法<sup>[2]</sup>外,其余的测定方法均参照常规方法和实验指南<sup>[1,5]</sup>。

# 结果与分析

## 一、大豆细菌性病害的发生情况

通过三年来对黑龙江省各大豆主要产区的调查表明:大豆细菌性病害在黑龙江省普遍发生,而且,北部地区明显重于南部地区。带病种子表现为侵入点呈灰白色,周围有褐色油浸状扩展(图 1)。种子带菌率平均为 4.8%。带病种子出土后,子叶发病一般表现为病斑中央褐色,周围褪绿,呈水浸状(图 2)。病子叶率为 2.20—2.88%。复叶发病表现为多角形水浸斑或褐色坏死斑,周围出现褪绿圈(图 3)。成株期的病情指数为 10.74—20.22。

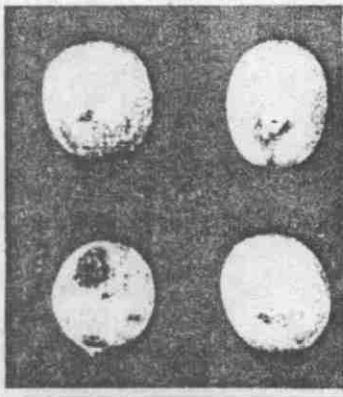


图1 种子上症状

Fig. 1 Symptom on seed



图2 子叶上症状

Fig. 2 Symptom on cotyledon

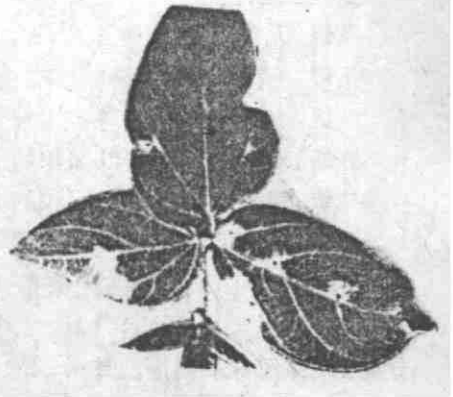


图3 复叶上症状

Fig. 3 Symptom on trifoliate leaf

## 二、致病性测定

根据从各地采样、分离、纯化得到的分离物在大豆上的致病性测定结果,  $S_3$  等 15 个菌株对大豆具有致病性。这些菌株在大豆复叶上开始引起小水浸点, 逐渐扩大呈多角形或不规则形水浸斑, 后期水浸斑变成褐色坏死斑, 周围出现褪绿晕圈。当新叶发病时伴随叶片扭曲, 畸形症状。

## 三、烟草过敏性反应

经注入 15 个供试菌株细菌悬浮液的烟草叶片组织, 均产生过敏性反应, 注入区域呈灰色坏死, 组织变薄。

## 四、染色、形态及培养特征

供试的 15 个菌株均呈革兰氏染色阴性, 菌体短杆状, 大小在  $0.5-0.8 \times 1.5-3.0$  微米之间, 极生 1-4 根鞭毛, 有荚膜, 无芽胞。在 NA 平板上菌落呈乳白色、圆形、微突起, 透明或半透明, 菌落直径约 0.5-1 毫米; 在 KB 培养基上产生黄绿色的荧光; 在 NB 液体培养基中呈半透明的混浊状; 在含蔗糖培养基中能产生果聚糖。

## 五、生理生化特征

测定结果(表 1 和表 2): 供试的 15 个菌株均表现为氧化酶阴性, 马铃薯不腐烂, 精氨酸双水解酶阴性, 过氧化氢酶阳性, 脲酶阳性, 卵磷脂酶阴性, 产氨阳性, 不能液化明胶, 不能还原硝酸盐, 不水解淀粉, 不水解七叶灵, 不产生  $H_2S$ , 不产生吲哚, 35℃ 能生长, 37℃ 以上不能生长, 适宜生长温度为 25-27℃, 耐盐性为 4.0-4.5%。

供试的 15 个菌株都能利用葡萄糖氧化产酸, 不发酵; 蔗糖、甘露糖、半乳糖、L-阿拉伯糖、肌醇、山梨糖、果糖和木糖都能利用; 不能利用乳糖、D-阿拉伯糖、纤维二糖、菊糖、鼠李糖、海藻糖、山梨醇和水杨素; 对于甘露醇,  $S_4$ 、 $S_5$ 、 $S_{10}$ 、 $S_{21}$ 、 $S_{25}$ 、 $S_{31}$ 、 $S_{31-2}$ 、 $S_{37}$ 、 $S_{46}$  和  $S_{47}$  都能利用, 其余菌株不能利用; 对于甘油,  $S_5$ 、 $S_{25}$ 、 $S_{31}$ 、 $S_{31-2}$ 、 $S_{36}$ 、 $S_{46}$  和  $S_{47}$  能利用, 而其余菌株不能利用。

表 1 供试菌株的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of tested isolates

特 征 Characteristics		菌 株 Isolates	所有 15 个供试菌株 All 15 tested isolates
氧化酶	Oxidase activity		— *
马铃薯软腐	Rot of potato		—
果聚糖产生	Levan production		+
精氨酸双水解酶	Arginine dihydrolase activity		—
烟草过敏性反应	Tobacco hypersensitivity reaction		+
过氧化氢酶	Catalase activity		+
脲酶	Urease		+
卵磷脂酶	Lecithinase activity		—
明胶液化	Gelatin liquefaction		—
硝酸盐还原	Nitrate reduction		—
淀粉水解	Starch hydrolysis		—
七叶灵水解	Aesculin hydrolysis		—
H <sub>2</sub> S 水解	H <sub>2</sub> S production		—
吲哚产生	Indole production		—
产氨	Ammonia production		+
柠檬酸盐利用	Citrate utilization		+
生长温度 Growth temperature	32℃		+++
	35℃		+
	37℃		—
	40℃		—
耐盐性 Salt—resistance	2.0%		+
	2.5%		+
	3.0%		+
	3.5%		+
	4.0%		+
	4.5%		—
	5.0%		—

\* +: 阳性反应 Positive reaction      —: 阴性反应 Negative reaction  
 \*\* +: 生长 Growth      —: 不生长 No growth

表 2 供试菌株对碳源的利用  
Table 2 Utilization of carbon for growth of tested isolates

碳 源 Carbons		菌 株 Isolates	S <sub>5</sub> 、S <sub>25</sub> 、S <sub>31</sub> S <sub>31-2</sub> 、S <sub>46</sub> 、S <sub>47</sub>	S <sub>3</sub> 、S <sub>20</sub> S <sub>26</sub> 、S <sub>43</sub>	S <sub>4</sub> 、S <sub>10</sub> S <sub>21</sub> 、S <sub>37</sub>	S <sub>36</sub>
葡萄糖 Glucose	开管 Opened tube		+	+	+	+
	闭管 Closed tube		—	—	—	—
蔗糖	Sucrose		+	+	+	+
甘露糖	Mannose		+	+	+	+
半乳糖	Galactose		+	+	+	+
L—阿拉伯糖	L—Arabinose		+	+	+	+
肌糖	Inositol		+	+	+	+
山梨糖	Sorbose		+	+	+	+
果糖	Fructose		+	+	+	+
木糖	Xylose		+	+	+	+
甘露醇	Mannitol		+	—	+	—
甘油	Glycerol		+	—	—	+
乳糖	Lactose		—	—	—	—
D—阿拉伯糖	D—Arabinose		—	—	—	—
纤维二糖	Cellobiose		—	—	—	—
菊糖	Inulin		—	—	—	—
鼠李糖	Rhamnose		—	—	—	—
海藻糖	Trehalose dihydrate		—	—	—	—
山梨醇	Sorbitol		—	—	—	—
水杨素	Salicin		—	—	—	—

\* +:利用 Utilization      —:不利用 No utilization

结论与讨论

根据供试菌株菌体直杆状,极生 1—4 根鞭毛,革兰氏染色阴性,代谢作用为呼吸型,而不是发酵型,过氧化氢酶阳性,参照《伯捷手册》<sup>[8]</sup>,供试的 15 个菌株均属假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)供试菌株在 KB 培养基上产生荧光,氧化酶阴性,精氨酸双水解酶阴性,硝酸盐还原阴性,41℃ 不生长,不利用海藻糖和 D—阿拉伯糖,这些分类特征表明:供试的 15 个菌株均属于丁香假单胞杆菌(*Pseudomonas syringae*)。丁香假单胞杆菌是一个庞大的种。《伯捷手册》第八版将以前许多独立的种归在这一种内。后来,Dye 等<sup>[9]</sup>将假单胞杆菌属中的许多种列为丁香假单胞杆菌内的致病变种。根据供试菌株产生果聚糖,不液化明胶,不水解淀粉,不产生吡嗪,硝酸盐还原阴性,能利用 D—果糖、甘露醇和肌醇,不能利用海藻糖、D—阿拉伯糖、鼠李糖、水杨素,以及在大豆上引起的典型症状,供试的 15 个菌株

均属于丁香假单胞杆菌大豆致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Cooper 1919) Yong, Dye & Wilkie, 1978)。因此,黑龙江省大豆细菌性病害是由该病菌引起的大豆细菌性疫病。对甘露醇和甘油的利用,不同的菌株间有差异(表 2)。袁美丽<sup>[7]</sup>和王国馨<sup>[3]</sup>报道大豆细菌性疫病菌均能利用甘露醇。但供试的菌株中,有些菌株能利用,有些菌株不能利用甘露醇。Thomas<sup>[11]</sup>研究表明:大豆细菌性疫病菌不同生理小种对木糖的利用有差异。对甘露醇和甘油的利用是否可作为划分生理小种的特征,有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] 中国科学院微生物研究所细菌分类组:1978,一般细菌常用鉴定方法,科学出版社
- [2] 方中达:1977,植病研究法,农业出版社
- [3] 王国馨:1988,湖南农业科学,(4):36—40
- [4] 张佩等:1988,贵州农业科学,(2):12—17
- [5] 张克勤译:1986,植物病原细菌鉴定实验指南,贵州人民出版社
- [6] 俞大绂等:1956,农业学报,7(3):359—363
- [7] 袁美丽:1983,吉林农业大学学报,(4):1—6
- [8] Buchanan, R. E. et al.: 1974, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Eight Edition
- [9] Dye, D. W. et al.: 1980, *Review of Plant Pathology*, 59(4): 155—168
- [10] Sinclair, J. B. et al.: 1989, *Compendium of Soybean Diseases*. Third Edition, The American Phytopathological Society Press
- [11] Thomas, M. D. et al.: 1980, *Phytopathology*, 70(4): 310—312

## IDENTIFICATION OF THE BACTERIAL BLIGHT PATHOGEN OF SOYBEAN IN HEILONGJIANG PROVINCE

Li Yonghao      Zhang Yuan      Zhang Minghou

(Department of Plant Protection, Northeast Agricultural University Harbin, 150030)

### Abstract

By the assay of pathogenicity, morphology, physiological and biochemical characters of 15 isolates from soybean in Heilongjiang province, all were designated as *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Cooper 1919) Yong, Dye Wilkie 1979, causing bacterial blight of soybean.

**Key words** Soybean; *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*; Pathogen identification