

福建省青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性研究

王秋红^{1,2}, 陈亮¹, 林营志², 朱育菁², 蓝江林², 杨淑佳^{1,2}, 刘波²(¹厦门大学生命科学院, 厦门 361005; ²福建省农业科学院生物技术研究所, 福州 350003)

摘要:【目的】利用气相色谱技术检测福建省的 40 株青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)菌株细胞内的脂肪酸, 分析其脂肪酸分布的多态性; 研究青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性与青枯雷尔氏菌现有种下分化方法之间的关系。【方法】对 40 株青枯雷尔氏菌脂肪酸进行气相色谱分析, 比较同一寄主分离的青枯雷尔氏菌和不同寄主分离的青枯雷尔氏菌脂肪酸的分布; 对 40 株青枯雷尔氏菌脂肪酸进行聚类分析, 分析聚成的各类青枯雷尔氏菌脂肪酸的特点以及脂肪酸多态性与其生理小种、生化型和致病性之间的关系。【结果】同一寄主分离的青枯雷尔氏菌和不同寄主分离的青枯雷尔氏菌, 其脂肪酸都存在着明显的多态性; 对 40 株青枯雷尔氏菌的脂肪酸进行聚类分析, 可以聚成 3 类, 即 group 1、group 2 和 group 3; 青枯雷尔氏菌生理小种 1 存在着不同的脂肪酸类群, 青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性与其生化型之间不存在相关性, 但是脂肪酸和致病性之间存在一定的相关性: group 1 为无致病性菌株, group 2 为过渡性菌株, group 3 为强致病性菌株。【结论】福建省青枯雷尔氏菌脂肪酸分布存在着明显的多态性; 青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性与致病性之间存在一定的相关性, 脂肪酸有望成为青枯雷尔氏菌小种鉴定的新指标。

关键词: 青枯雷尔氏菌; 脂肪酸; 多态性; 气相色谱

Polymorphism of Fatty Acid of *Ralstonia solanacearum* in Fujian Province

WANG Qiu-hong^{1,2}, CHEN Liang¹, LIN Ying-zhi², ZHU Yu-jing², LAN Jiang-lin², YANG Shu-jia^{1,2}, LIU Bo²(¹School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005; ²Institute of Biotechnology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003)

Abstract: 【Objective】 The fatty acids of 40 strains of *Ralstonia solanacearum* isolated from different hosts in the fields in Fujian Province were detected by gas chromatography (GC). The polymorphism of *R. solanacearum* fatty acids relating to the pathogenicity was observed. 【Method】 The MIDI system and cluster analysis were introduced in analyzing fatty acids to display the relations among the polymorphism, race, biovar type and pathogenicity. 【Result】 The results showed that the patterns of fatty acids were significant different in *R. solanacearum* strains both isolated from the different hosts and the different body parts of the same hosts. According to the fatty acids the strains were clustered into three groups, e.g. group 1 relating to the strains with non-pathogenicity, group 2 in which the strain pathogenicity was changeable with some virulent and avirulent ones, and group 3 respondent to high pathogenicity. It was proved that the model of fatty acids has no relations to races and biovar types in *R. solanacearum*. 【Conclusion】 It is the first time to describe the polymorphism of fatty acids in *R. solanacearum* in this paper. The pathogenicity could be grouped by the models of fatty acids to distinguish the pathogenicity, which could be used in the identification of *R. solanacearum* under species differentiation.

Key words: *Ralstonia solanacearum*; Fatty acid; Polymorphism; Gas chromatography

收稿日期: 2006-07-27; 接受日期: 2007-01-08

基金项目: 国家“863”项目(2002AA244031)和福建省青年科技人才创新项目(2003J046)

作者简介: 王秋红(1981-), 女, 山东德州人, 研究方向为植物病害微生物及其生物防治。Tel: 0591-87308112。通讯作者刘波(1957-), 男, 福建惠安人, 研究员, 博士, 研究方向为生物农药和生物技术。E-mail: laeptb@163.com, fzliubo@163.com

0 引言

【研究意义】细菌性青枯病是一种由青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起的毁灭性土传病害。青枯雷尔氏菌可危害 44 个科 300 多种植物,造成农林生产巨大经济损失,是福建省内许多作物上发生的毁灭性病害。青枯雷尔氏菌在寄主范围、地理分布、致病特征、流行特征、种下分化等方面存在较大的差异,具有明显的多态性^[1]。【前人研究进展】青枯雷尔氏菌的种下分化复杂,前人从生理小种 (race)^[2]、生化型 (biovar)^[3]、血清型 (serotype)^[4]、溶源型 (lysotype)^[5]、基因型 (genotype)^[6]等方面对种下分化进行研究。生理小种依据青枯雷尔氏菌在鉴别寄主上的致病性进行分类^[7],但是姚革等^[8]应用该方法分析了四川省青枯雷尔氏菌的菌系及其分布,结果表明,同一生理小种中存在着不同的致病类型菌株。按对 3 种双糖和 3 种六碳醇的利用情况,将青枯雷尔氏菌分为不同的生化型^[9,10]。这种分类主要体现在青枯雷尔氏菌的地理分布和种群进化上。王国平等^[11]分析了湖南省烟草青枯雷尔氏菌的生化型,认为青枯雷尔氏菌致病力的强弱与生化型没有直接的相关性。用血清型、溶源型、基因型分析,操作复杂,仍不能解决致病力分化问题^[5,12-14]。脂肪酸是生物体内不可缺少的能量和营养物质,是生物体的基本结构成分之一,在细胞中绝大部分脂肪酸以结合形式存在,构成具有重要生理功能的脂类,它是构成生物膜的重要物质;是有机体代谢所需燃料的贮存形式;作为细胞表面物质与细胞识别、种族特异性和细胞免疫等有密切关系。脂肪酸和细菌的遗传变异、毒力、耐药性等有极为密切的关系^[15,16]。细菌的细胞结构中普遍含有的脂肪酸成分与细菌的 DNA 具有高度的同源性,各种细菌具有其特征性的细胞脂肪酸指纹图谱^[17]。目前,国内外已有把脂肪酸用于细菌鉴定的报道^[15,18-20]。由于青枯雷尔氏菌存在着复杂的种下分化,研究其脂肪酸的多态性并分析它与青枯雷尔氏菌现有种下分化方法的关系将具有重要的意义。【本研究的切入点】因此,可以分析青枯雷尔氏菌脂肪酸的多态性分布;对青枯雷尔氏菌的脂肪酸进行聚类分析;并分析青枯雷尔氏菌脂肪酸与其生理小种、生化型和致病性之间的关系。【拟解决的关键问题】拟通过气相色谱技术快速、灵敏、准确地检出青枯雷尔氏菌细胞内的脂肪酸,分析其脂肪酸分布的多态性,初步探讨将脂肪酸应用于青枯雷尔氏菌种下分化的可行性。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

从福建省经济作物番茄、茄子、辣椒和生姜青枯病严重发生的田块采集植株样本,参照方中达的方法^[21],用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑培养基 (简称 TTC) 培养基分离纯化,得到 40 株青枯雷尔氏菌,保存于 20~25 的无菌水中^[22],备用。菌种来源见表 1。

1.2 青枯雷尔氏菌脂肪酸的提取和气相色谱分析

1.2.1 培养基与脂肪酸提取试剂

TSBA 培养基:30 g 胰蛋白胍大豆肉汤 (Tryptic soy broth, TSB)+15 g 琼脂+1 L 水 (TSB 购于 Fisher 公司)。皂化试剂:氢氧化钠 45 g+甲醇 150 ml+水 150 ml。甲基化试剂:6 N 盐酸 325 ml+甲醇 275 ml。萃取试剂:正己烷 200 ml+甲基叔丁基乙醚 200 ml。洗涤试剂:氢氧化钠 10.8 g+水 900 ml。(配制方法由 MIDI 公司提供)

1.2.2 脂肪酸的提取

(1) 细菌培养条件:TSBA 平板培养基,四线划线法,培养温度 (28±1),培养时间 (24±2) h;

(2) 获菌:用接种环挑取 3~5 环(约 40 mg 湿重)的菌落置入一个干净、干燥的有螺旋盖的试管中(最佳的获菌区域为第 3 区);

(3) 皂化:加入 (1.0±0.1) ml 皂化试剂,拧紧盖子,振荡 5~10 s,放入 95~100 的沸水中 5 min,室温冷却,振荡 5~10 s,再水浴 25 min,室温冷却;

(4) 甲基化:开盖加入 (2.0±0.1) mL 甲基化试剂,拧紧盖子,振荡 5~10 s, (80±1) 水浴 10 min,移开且快速用流动自来水冷却至室温;

(5) 萃取:加入 (1.25±0.1) ml 的萃取试剂,拧紧盖子,温和混合旋转 10 min,打开管盖,利用干净的移液管取出每个样本的下层水相部分;

(6) 基本洗涤:加入 (3.0±0.2) ml 洗涤试剂,拧紧盖子,温和混合旋转 5 min,打开管盖,利用干净的移液管移出约 2/3 体积的上层有机相到干净的气相色谱检体小瓶,用于气相检测。

1.2.3 脂肪酸的检测 气相色谱系统采用的是美国 Agilent 6890N 型,包括全自动进样装置、石英毛细管柱及氢火焰离子化检测器;分析软件应用美国 MIDI 公司开发的基于细菌细胞脂肪酸成分鉴定细菌的软件 Sherlock MIS4.5 (microbial identification system) 和 LGS4.5 (library generation software)。在下述色谱条件下平行分析脂肪酸甲酯混合物标样和待检样本:二

表 1 菌种来源

Table 1 The sources of microbial strains

序号 Serial number	菌株编号 Strain number	采集地 Place of source	寄主 Host plant	采集时间 Collection date
1	Rs-T.1.3-010702-01	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
2	Rs-T.1.3-010702-02	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
3	Rs-T.1.3-010702-03	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
4	Rs-T.1.3-010702-04	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
5	Rs-T.1.3-010702-05	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
6	Rs-T.1.3-010702-06	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
7	Rs-T.1.3-010702-07	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
8	Rs-T.1.3-010702-08	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
9	Rs-T.1.3-010702-09	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
10	Rs-T.1.3-010702-10	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
11	Rs-T.1.3-010702-11	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
12	Rs-T.1.3-010702-12	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
13	Rs-T.1.3-010702-13	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
14	Rs-T.1.3-010702-14	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
15	Rs-T.1.3-010702-15	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
16	Rs-T.1.3-010702-16	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
17	Rs-T.1.3-010702-17	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
18	Rs-T.1.3-010702-18	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
19	Rs-T.1.3-010702-19	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
20	Rs-T.1.3-010702-20	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
21	Rs-T.1.3-010702-21	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
22	Rs-T.1.3-010702-22	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
23	Rs-T.1.3-010702-23	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
24	Rs-T.1.3-010702-24	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
25	Rs-T.1.3-010702-25	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
26	Rs-T.1.3-010702-26	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
27	Rs-T.1.3-010702-27	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
28	Rs-T.1.3-010702-28	福州北峰 Fuzhoubeifeng	番茄 Tomato	20010702
29	Rs-T.1.1-010615-01	福州建新 Fuzhoujianxin	番茄 Tomato	20010615
30	Rs-T.1.2-010618-01	福州农大 Fuzhounongda	番茄 Tomato	20010618
31	Rs-P.1.4-010704-01	福州永泰 Fuzhouyongtai	辣椒 Pepper	20010704
32	Rs-P.1.4-010704-02	福州永泰 Fuzhouyongtai	辣椒 Pepper	20010704
33	Rs-G.1.4-010704-01	福州永泰 Fuzhouyongtai	生姜 Ginger	20010704
34	Rs-G.1.4-010704-02	福州永泰 Fuzhouyongtai	生姜 Ginger	20010704
35	Rs-E.1.3-010719-01	福州北峰 Fuzhoubeifeng	茄子 Eggplant	20010719
36	Rs-E.1.3-020626-02	福州北峰 Fuzhoubeifeng	茄子 Eggplant	20020626
37	Rs-E.1.3-020626-03	福州北峰 Fuzhoubeifeng	茄子 Eggplant	20020626
38	Rs-E.1.3-020626-04	福州北峰 Fuzhoubeifeng	茄子 Eggplant	20020626
39	Rs-E.1.3-010620-05	福建南平 Fujiannanping	茄子 Eggplant	20010620
40	Rs-E.2.1-050914-01	厦门同安 Xiamentongan	茄子 Eggplant	20050914

阶程序升高柱温, 170 起始, 5 /min 升至 260 , 而后 40 /min 升温至 310 , 维持 90 s ; 汽化室温度 250 、检测器温度 300 ; 载气为氢气 (2 ml·min⁻¹)、尾气为氮气 (30 ml·min⁻¹) ; 柱前压 10.00 psi (1 psi=6.895 kPa) ; 进样量 1 μl, 进样分流比 100 : 1。

1.3 青枯雷尔氏菌脂肪酸的多态性分析

1.3.1 同一寄主分离的青枯雷尔氏菌的脂肪酸分布多态性 选择青枯病发生严重的茄科植物番茄作为供试寄主, 将由分别采自福州北峰、福州农大和福州建新的番茄青枯病样本中分离到 9 株青枯雷尔氏菌作为研究对象, 按与 1.2 相同方法提取脂肪酸和进行检测, 分析它们的脂肪酸的种类与主要脂肪酸含量的差异。

1.3.2 不同寄主分离的青枯雷尔氏菌的脂肪酸分布多态性 选择从不同的发病植物番茄、辣椒、生姜和茄子上分离的 4 株青枯雷尔氏菌作为供试菌株, 按方法 1.2 提取脂肪酸和进行检测, 分析它们的脂肪酸的种类与主要脂肪酸含量的差异。

1.3.3 青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性的聚类分析 对分离的 40 株青枯雷尔氏菌 (表 1) 按与 1.2 相同的方法提取脂肪酸和进行检测, 利用 LGS 软件对 40 株青枯雷尔氏菌脂肪酸色谱结果进行聚类分析, 得出系统树图 (Dendrogram) 并进行分类, 分析聚成的各类的脂肪酸特点及主要差别。

1.3.4 青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性与生理小种的关系 用 TTC 平板培养基将保存在 20~25 无菌水中的菌株划线培养 48 h, 配成 2×10^9 cfu/ml 菌悬液, 采用剪叶接种法, 在鉴别寄主茄子 (5~7 叶期)、香蕉 (6~9 叶期) 上接种, 用清水接种为对照, 接种后置于 28~30 的人工气候箱内培养, 逐日观察植株的症状表现。按 Buddenhagen 等^[7]提出的青枯雷尔氏菌生理小种的鉴定方法进行分类, 采用排除法, 即若不能侵染香蕉则非生理小种 2, 若可侵染茄子则非生理小种 3。比较青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性与其生理小种之间是否存在相对应的关系。

1.3.5 青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性与生化型的关系 在 TTC 平板培养基上培养青枯雷尔氏菌单细胞菌落, 用接种针挑取单细胞菌落, 接种于分别含有乳糖、麦芽糖、纤维二糖、甘露醇、山梨醇和甜醇的标准培养基里 (由杭州天和微生物试剂有限公司提供), 置于 28~30 的培养箱中培养, 观察供试菌株对 3 种双糖和 3 种 6 碳醇的利用情况, 确定 40 株菌株的生化型^[9,10]。比较青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性与其生化型之间是否

存在相对应的关系。

1.3.6 青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性与致病性的关系 在 TTC 平板培养基上培养青枯雷尔氏菌单细胞菌落, 按照刘波等^[23]建立的弱化指数的测定方法, 测定 40 株供试菌株的弱化指数 ($N=D_1/D_2$, 其中 N 为弱化指数, D_1 和 D_2 分别表示在 TTC 平板培养基上青枯雷尔氏菌细胞单菌落的红斑半径和菌落半径)。同时进行番茄组培苗回接, 每个菌株回接 30 株组培苗, 设清水对照, 将回接的组培苗放置于 28~30 的人工气候箱内培养, 10 d 后观察发病率。根据弱化指数和回接发病率, 确定其致病类型, 菌株的致病性区间划分如下: 弱化指数 < 0.60 时, 菌株回接发病率为 100%, 定义为强致病力菌株; 弱化指数 > 0.80 时, 菌株回接发病率为 0, 定义为无致病性菌株; 弱化指数介于 0.60 和 0.80 之间的, 菌株的致病性为不确定性, 定义为过渡性菌株^[23]。比较青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性与其致病性之间是否存在相对应的关系。

2 结果与分析

2.1 同一寄主分离的青枯雷尔氏菌的脂肪酸分布多态性

分析从番茄发病植株上分离的 9 株青枯雷尔氏菌脂肪酸色谱图, 得出: 色谱峰的数量 (脂肪酸种类) 和 3 种主要脂肪酸的含量存在着显著性差异 (表 2)。各个菌株脂肪酸的种类多的可达到 21 种 (Rs-T.1.3-010702-01、Rs-T.1.3-010702-02), 少的只有 13 种 (Rs-T.1.3-010702-04), 差异较大; 在供试的 9 株菌中, 3 种主要脂肪酸 (C16 : 1ω7c/C15 : 0 ISO 2OH、C16 : 0 和 C18 : 1ω7c) 所占的总百分比含量为总脂肪酸的 69.65% 到 81.18%; 同时, 这 3 种主要的脂肪酸的含量也存在着明显的不同: C16 : 1ω7c/C15 : 0 ISO 2OH 在菌株 Rs-T.1.3-010702-03 的总脂肪酸中占 32.73%, 而在菌株 Rs-T.1.3-010702-07 中只有 23.55%; 在菌株 Rs-T.1.3-010702-01 的总脂肪酸中, C16 : 0 的含量高达 32.96%, 而在菌株 Rs-T.1.3-010702-02 中仅占 23.49%; C18 : 1ω7c 的最高含量为 23.52% (Rs-T.1.3-010702-03), 最低含量为 12.89% (Rs-T.1.3-010702-01)。

2.2 不同寄主分离的青枯雷尔氏菌的脂肪酸分布多态性

分析从不同的发病植物番茄、辣椒、生姜和茄子上分离的 4 株青枯雷尔氏菌的脂肪酸色谱图, 它们之间的差异见表 3。Rs-T.1.3-010702-01 脂肪酸的种类为

表 2 番茄植株上分离的青枯雷尔氏菌脂肪酸种类及其主要脂肪酸含量

Table 2 The percentage of plentiful fatty acids of *Ralstonia solanacearum* strains isolated from the tomato host

供试菌株 Strains	脂肪酸种类 Kinds of fatty acids	主要脂肪酸含量 Percentage of plentiful fatty acids (%)		
		C16 : 1 7c/C15:0 ISO 2OH	C16 : 0	C18 : 1 7c
Rs-T.1.1-010615-01	17	28.99	26.40	20.78
Rs-T.1.2-010618-01	17	26.33	29.32	18.34
Rs-T.1.3-010702-01	21	25.52	32.96	12.89
Rs-T.1.3-010702-02	21	31.31	23.49	22.32
Rs-T.1.3-010702-03	17	32.73	24.93	23.52
Rs-T.1.3-010702-04	13	30.59	27.46	20.10
Rs-T.1.3-010702-05	18	28.28	25.52	19.89
Rs-T.1.3-010702-06	17	31.12	25.33	21.74
Rs-T.1.3-010702-07	19	23.55	30.28	15.82

21 种, Rs-E.1.3-010719-01 只有 12 种。在供试的 4 株菌中, C16 : 1 ω 7c/C15 : 0 ISO 2OH、C16 : 0 和 C18 : 1 ω 7c 都为主要脂肪酸,所占的总百分比含量为总脂肪酸的 70.52% ~ 78.23%; 同时, C16 : 1 ω 7c/C15 : 0 ISO 2OH 在 Rs-E.1.3-010719-01 的脂肪酸总量中占 30.88%, 而在 Rs-T.1.3-010702-01 中只占 25.52%; 在 Rs-T.1.3-010702-01 中, C16 : 0 的含量高达 32.96%, 在 Rs-P.1.4-010704-01 中是 25.55%; C18 : 1 ω 7c 的最高含量为 22.02% (Rs-P.1.4-010704-01), 最低含量为 12.89% (Rs-T.1.3-010702-01)。

2.3 青枯雷尔氏菌菌株脂肪酸多态性聚类分析

利用 LGS 软件对 40 株青枯雷尔氏菌脂肪酸色谱结果进行聚类分析, 系统树图 (dendrogram) 见图 1。基于 LGS 软件, 样品的欧氏距离 (euclidian distance, λ) 在 10 或以下时为同一种菌 (species); 当 $\lambda=6$ 时, 表示同一种的不同类群。从图 1 可以看出, 当 $\lambda=6.00$ 时, 40 株青枯雷尔氏菌分成 3 个类群, 可用 group 、 、 表示。Group 包含了菌株 Rs-T.1.3-010702-26、Rs-T.1.3-010702-12、Rs-T.1.3-010702-11、Rs-T.1.3-

010702-16; Group 包含了菌株 Rs-T.1.3-010702-05、Rs-T.1.3-010702-15、Rs-T.1.3-010702-23、Rs-T.1.3-010702-09、Rs-T.1.3-010702-10、Rs-T.1.3-010702-22、Rs-T.1.3-010702-24、Rs-T.1.3-010702-13、Rs-P.1.4-010704-01、Rs-E.1.3-010620-05、Rs-T.1.3-010702-04、Rs-E.1.3-010709-01、Rs-T.1.3-010702-28、Rs-T.1.1-010615-01、Rs-T.1.3-010702-06、Rs-T.1.3-010702-08、Rs-T.1.3-010702-02、Rs-T.1.3-010702-03、Rs-E.2.1-050914-01; Group 包含了菌株 Rs-E.1.3-020626-02、Rs-G.1.4-010704-01、Rs-E.1.3-020626-03、Rs-E.1.3-020626-04、Rs-T.1.3-010702-14、Rs-T.1.3-010702-20、Rs-P.1.4-010704-02、Rs-T.1.3-010702-18、Rs-T.1.3-010702-01、Rs-T.1.3-010702-19、Rs-T.1.3-010702-07、Rs-T.1.3-010702-21、Rs-T.1.3-010702-17、Rs-T.1.3-010702-25、Rs-T.1.3-010702-27、Rs-T.1.2-010618-01、Rs-G.1.4-010704-02。

Group 、 、 的典型脂肪酸色谱图见图 2。3 个类群各自的脂肪酸分布特点见表 4。3 个类群脂肪酸之间的主要差异: (1) 平均脂肪酸种类: Group

表 3 不同寄主分离的青枯雷尔氏菌脂肪酸种类及其主要脂肪酸含量

Table 3 The percentage of plentiful fatty acids of *Ralstonia solanacearum* strains isolated from different host plants

寄主 Host plants	供试菌株 Strains	脂肪酸种类 Kinds of fatty acids	主要脂肪酸含量 Percentage of plentiful fatty acids (%)		
			C16 : 1 7c/C15 : 0 ISO 2OH	C16 : 0	C18 : 1 7c
番茄 Tomato	Rs-T.1.3-010702-01	21	25.52	32.96	12.89
辣椒 Pepper	Rs-P.1.4-010704-01	19	30.66	25.55	22.02
生姜 Ginger	Rs-G.1.4-010704-01	17	26.58	30.31	13.63
茄子 Eggplant	Rs-E.1.3-010719-01	12	30.88	27.14	19.44

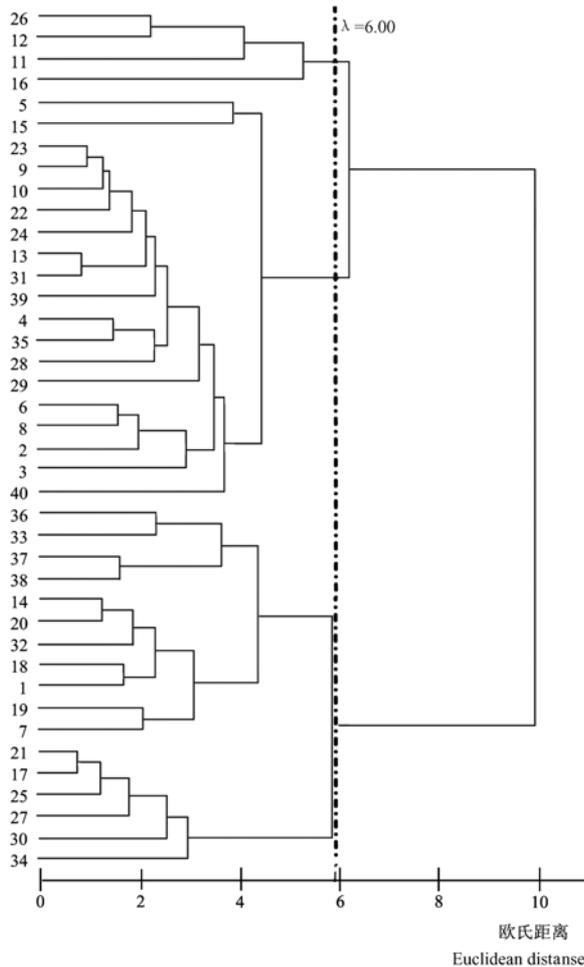


图 1 40 株供试青枯雷尔氏菌菌株脂肪酸的聚类分析
Fig. 1 Cluster analysis for 40 strains of *Ralstonia solanacearum* based on fatty acids

最多,有 22 种, Group 最少,有 17 种, Group 介于两者之间,有 19 种。(2)主要脂肪酸的平均含量: 3 个类群中含量最低的脂肪酸都是 C18:1 ω 7c,而在 Group 中其含量(16.23%)明显的低于其在 Group (20.21%)和 Group (21.14%)中的含量;含量最高的脂肪酸,在 Group 和 Group 中是 C16:

1 ω 7c/C15:0 ISO 2OH 含量最高,在 Group 中则是 C16:0 含量最高;C16:1 ω 7c/C15:0 ISO 2OH 和 C16:0 含量的差值,Group (9.01%)明显大于 Group (4.54%)。(3)在 Group 中,第 3 个特征性色谱峰 C16:1 ω 7c/C15:0 ISO 2OH 和第 4 个特征性色谱峰 C16:0 之间出现一个小的波峰,而在 Group 和 Group 中则没有。(4)代表非优势脂肪酸的小波峰,在 Group 中,主要集中在第 1 个特征性色谱峰 C14:0 和第 2 个特征性色谱峰 C14:0 3OH/C16:1 ISO 之间以及第 4 个特征性色谱峰 C16:0 和第 5 个特征性色谱峰 C18:1 ω 7c 之间,而在 Group 和 Group 中,只有第 4 个特征性色谱峰 C16:0 和第 5 个特征性色谱峰 C18:1 ω 7c 之间比较多。

2.4 青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性与生理小种的关系

40 株青枯雷尔氏菌生理小种的鉴定结果见表 5。供试的 40 株菌株均属于生理小种 1,按脂肪酸聚成的 3 个类群属于同一生理小种,表明青枯雷尔氏菌生理小种 1 可以属于不同的脂肪酸类群。

2.5 青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性与生化型的关系

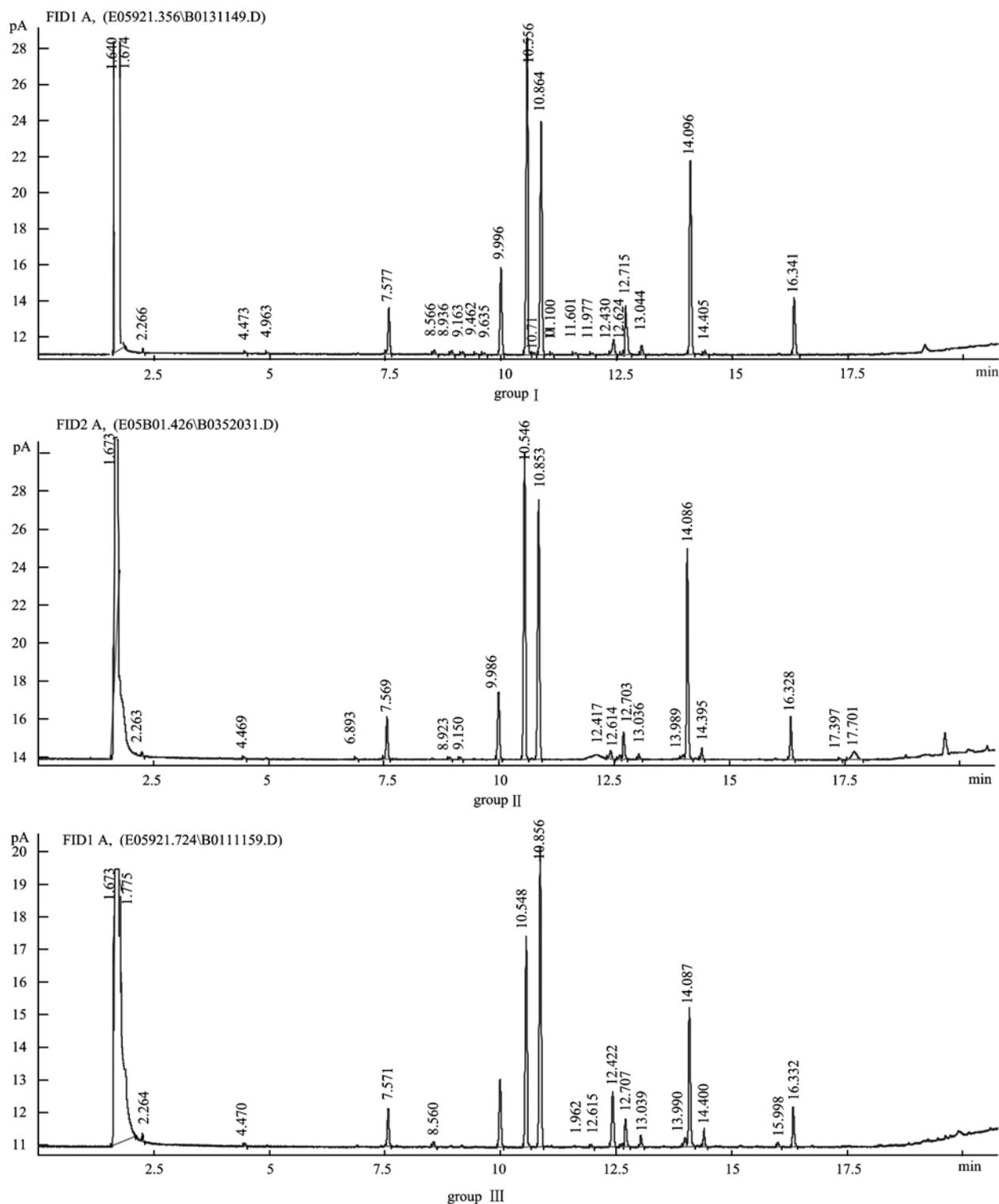
供试菌株符合生化型标准的菌株共有 29 株,不符合生化型标准的有 11 株^[9,10],暂定为“新型”^[24],见表 6。将生化型测定的结果进行编码,+为 1,-为 0,根据表 6 的数据组建矩阵,以欧氏距离为相关系数,用类平均方法进行系统聚类,结果见图 3,当 $\lambda=1.632$ 时,可将青枯雷尔氏菌分成 4 个类群,生化型类群 1 的占 22.5%,生化型类群 2 的占 57.5%,生化型类群 3 的占 12.5%,生化型类群 4 的占 7.5%。从表 6 可以看出,同一生化型类群可以属于不同的脂肪酸类群,同一脂肪酸类群也可以属于不同的生化型类群,表明青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性与生化型之间不存在相关性。

2.6 青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性与致病性的关系

测定供试的 40 株青枯雷尔氏菌的弱化指数和回接发病率,结果见表 7。从表中可以看出,Group

表 4 青枯雷尔氏菌脂肪酸类群的特点
Table 4 Fatty acids characteristics of three groups

脂肪酸类群 Group	平均脂肪酸种类 Average kinds of fatty acids	主要脂肪酸的平均含量 Average percentage of plentiful fatty acids (%)		
		C16:1 7c/C15:0 ISO 2OH	C16:0	C18:1 7c
	22	30.71	21.70	20.21
	17	30.52	25.98	21.14
	19	25.03	29.84	16.23



横坐标表示色谱分析时间(min)，纵坐标表示色谱峰高值；第一个色谱峰为溶剂波峰

Abscissa represents analyzing time of chromatogram and ordinate shows height of chromatogram peak; the solvent peak is the first

图 2 脂肪酸类群的典型色谱图

Fig. 2 Representative fatty acid chromatograms of three groups

表 5 青枯雷尔氏菌生理小种鉴定

Table 5 Identification on races of *Ralstonia solanacearum*

序号 Serial number	菌株编号 Strains number	生理小种 Race	脂肪酸类别 Group
1	Rs-T.1.3-010702-01	1	
2	Rs-T.1.3-010702-02	1	
3	Rs-T.1.3-010702-03	1	
4	Rs-T.1.3-010702-04	1	
5	Rs-T.1.3-010702-05	1	
6	Rs-T.1.3-010702-06	1	
7	Rs-T.1.3-010702-07	1	
8	Rs-T.1.3-010702-08	1	
9	Rs-T.1.3-010702-09	1	
10	Rs-T.1.3-010702-10	1	
11	Rs-T.1.3-010702-11	1	
12	Rs-T.1.3-010702-12	1	
13	Rs-T.1.3-010702-13	1	
14	Rs-T.1.3-010702-14	1	
15	Rs-T.1.3-010702-15	1	
16	Rs-T.1.3-010702-16	1	
17	Rs-T.1.3-010702-17	1	
18	Rs-T.1.3-010702-18	1	
19	Rs-T.1.3-010702-19	1	
20	Rs-T.1.3-010702-20	1	
21	Rs-T.1.3-010702-21	1	
22	Rs-T.1.3-010702-22	1	
23	Rs-T.1.3-010702-23	1	
24	Rs-T.1.3-010702-24	1	
25	Rs-T.1.3-010702-25	1	
26	Rs-T.1.3-010702-26	1	
27	Rs-T.1.3-010702-27	1	
28	Rs-T.1.3-010702-28	1	
29	Rs-T.1.1-010615-01	1	
30	Rs-T.1.2-010618-01	1	
31	Rs-P.1.4-010704-01	1	
32	Rs-P.1.4-010704-02	1	
33	Rs-G.1.4-010704-01	1	
34	Rs-G.1.4-010704-02	1	
35	Rs-E.1.3-010719-01	1	
36	Rs-E.1.3-020626-02	1	
37	Rs-E.1.3-020626-03	1	
38	Rs-E.1.3-020626-04	1	
39	Rs-E.1.3-010620-05	1	
40	Rs-E.2.1-050914-01	1	

菌株的弱化指数 > 0.80, 菌株回接发病率为 0, 为无致病性菌株; Group 的弱化指数 < 0.60, 菌株回接发

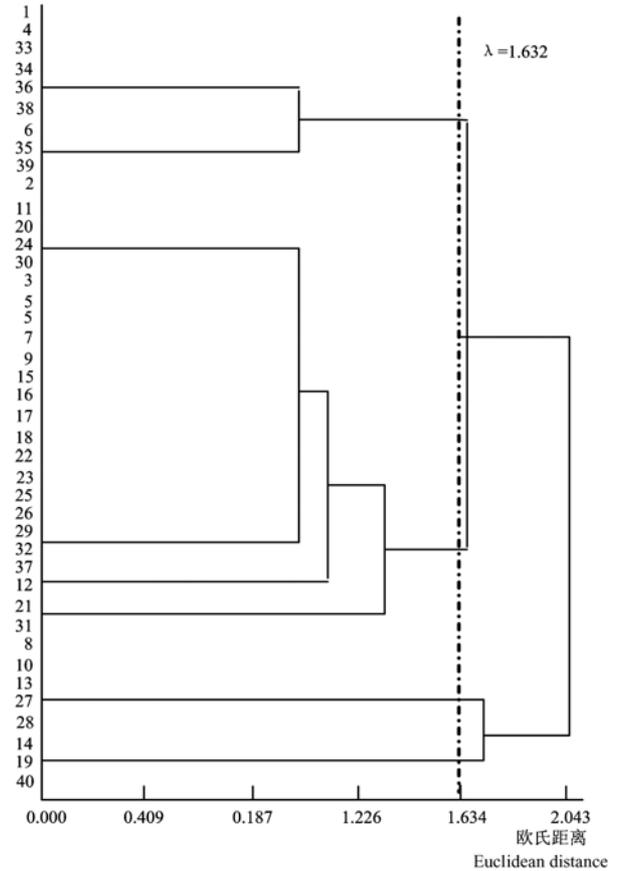


图 3 青枯雷尔氏菌生化型聚类分析结果

Fig. 3 Cluster analysis on biovar type of *Ralstonia solanacearum*

病率为 100%, 为强致病性菌株; Group 的弱化指数介于 0.60 和 0.80 之间, 菌株回接发病率在 6.7% ~ 100% 之间变动, 为过渡性菌株^[23]。表明青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性与致病性之间存在一定的相关性。Group 和 Group 的回接发病率分别为 0 和 100%, 而 Group 的回接发病率在 6.7% ~ 100% 的区间内变动, 这可能与青枯雷尔氏菌在人工培养条件下易发生致病性变异, 致病力会有所下降或消失有关^[25]。

3 讨论

气相色谱技术是一种分离效能高、分析速度快、灵敏性及特异性高的分离分析方法, 应用气相色谱技术和 Sherlock MIS 数据分析系统分析青枯雷尔氏菌脂肪酸可通过单次试验将青枯雷尔氏菌鉴定到种。该方法采用的是高精密的分析仪器, 分析对象是可随生长环境发生变化的细胞脂肪酸成分, 因此分析过程的条件选择和质量控制则显得非常重要, 必须对培养基成

表 6 青枯雷尔氏菌生化型测定结果

Table 6 Biovar type of *Ralstonia solanacearum*

序号 Serial number	菌株编号 Strains number	乳糖 Lactose	麦芽糖 Maltose	纤维糖 Inositol	甘露醇 Mannitol	山梨醇 Sorbitol	甜醇 Dulcitol	生化型 Biovar type	生化型类群 Biovar. group	脂肪酸类群 Fatty acid group
1	Rs-T.1.3-010702-01	-	-	-	-	-	-		1	
2	Rs-T.1.3-010702-02	+	+	-	-	-	-	“新型” New type	2	
3	Rs-T.1.3-010702-03	+	+	+	-	-	-		2	
4	Rs-T.1.3-010702-04	-	-	-	-	-	-		1	
5	Rs-T.1.3-010702-05	+	+	+	-	-	-		2	
6	Rs-T.1.3-010702-06	-	-	+	-	-	-	“新型” New type	1	
7	Rs-T.1.3-010702-07	+	+	+	-	-	-		2	
8	Rs-T.1.3-010702-08	+	+	+	+	+	+		3	
9	Rs-T.1.3-010702-09	+	+	+	-	-	-		2	
10	Rs-T.1.3-010702-10	+	+	+	+	+	+		3	
11	Rs-T.1.3-010702-11	+	+	-	-	-	-	“新型” New type	2	
12	Rs-T.1.3-010702-12	+	+	+	-	-	+	“新型” New type	2	
13	Rs-T.1.3-010702-13	+	+	+	+	+	+		3	
14	Rs-T.1.3-010702-14	-	-	-	+	+	+		4	
15	Rs-T.1.3-010702-15	+	+	+	-	-	-		2	
16	Rs-T.1.3-010702-16	+	+	+	-	-	-		2	
17	Rs-T.1.3-010702-17	+	+	+	-	-	-		2	
18	Rs-T.1.3-010702-18	+	+	+	-	-	-		2	
19	Rs-T.1.3-010702-19	-	-	-	+	+	+		4	
20	Rs-T.1.3-010702-20	+	+	-	-	-	-	“新型” New type	2	
21	Rs-T.1.3-010702-21	+	+	-	+	-	-	“新型” New type	2	
22	Rs-T.1.3-010702-22	+	+	+	-	-	-		2	
23	Rs-T.1.3-010702-23	+	+	+	-	-	-		2	
24	Rs-T.1.3-010702-24	+	+	-	-	-	-	“新型” New type	2	
25	Rs-T.1.3-010702-25	+	+	+	-	-	-		2	
26	Rs-T.1.3-010702-26	+	+	+	-	-	-		2	
27	Rs-T.1.3-010702-27	+	+	+	+	+	+		3	
28	Rs-T.1.3-010702-28	+	+	+	+	+	+		3	
29	Rs-T.1.1-010615-01	+	+	+	-	-	-		2	
30	Rs-T.1.2-010618-01	+	+	-	-	-	-	“新型” New type	2	
31	Rs-P.1.4-010704-01	+	+	-	+	-	-	“新型” New type	2	
32	Rs-P.1.4-010704-02	+	+	+	-	-	-		2	
33	Rs-G.1.4-010704-01	-	-	-	-	-	-		1	
34	Rs-G.1.4-010704-02	-	-	-	-	-	-		1	
35	Rs-E.1.3-010719-01	-	-	+	-	-	-	“新型” New type	1	
36	Rs-E.1.3-020626-02	-	-	-	-	-	-		1	
37	Rs-E.1.3-020626-03	+	+	+	-	-	-		2	
38	Rs-E.1.3-020626-04	-	-	-	-	-	-		1	
39	Rs-E.1.3-010620-05	-	-	+	-	-	-	“新型” New type	1	
40	Rs-E.2.1-050914-01	-	-	-	+	+	+		4	

表 7 青枯雷尔氏菌致病性测定结果

Table 7 Pathogenicity of *Ralstonia solanacearum*

序号 Serial number	菌株编号 Strains number	弱化指数 Attenuation index	发病率(%) Mortality	致病类型 Type of pathogenicity	脂肪酸类群 Fatty acid group
1	Rs-T.1.3-010702-01	0.45	100.0	强致病性菌株 Pathoype	
2	Rs-T.1.3-010702-02	0.70	83.3	过渡性菌株 Trans-pathotype	
3	Rs-T.1.3-010702-03	0.79	86.7	过渡性菌株 Trans-pathotype	
4	Rs-T.1.3-010702-04	0.63	100.0	过渡性菌株 Trans-pathotype	
5	Rs-T.1.3-010702-05	0.61	80.0	过渡性菌株 Trans-pathotype	
6	Rs-T.1.3-010702-06	0.69	90.0	过渡性菌株 Trans-pathotype	
7	Rs-T.1.3-010702-07	0.58	100.0	强致病性菌株 Pathoype	
8	Rs-T.1.3-010702-08	0.75	6.7	过渡性菌株 Trans-pathotype	
9	Rs-T.1.3-010702-09	0.64	100.0	过渡性菌株 Trans-pathotype	
10	Rs-T.1.3-010702-10	0.78	10.0	过渡性菌株 Trans-pathotype	
11	Rs-T.1.3-010702-11	0.91	0.0	无致病性菌株 Non-pathotype	
12	Rs-T.1.3-010702-12	0.85	0.0	无致病性菌株 Non-pathotype	
13	Rs-T.1.3-010702-13	0.74	63.3	过渡性菌株 Trans-pathotype	
14	Rs-T.1.3-010702-14	0.59	96.7	强致病性菌株 Pathoype	
15	Rs-T.1.3-010702-15	0.77	16.7	过渡性菌株 Trans-pathotype	
16	Rs-T.1.3-010702-16	0.91	0.0	无致病性菌株 Non-pathotype	
17	Rs-T.1.3-010702-17	0.54	100.0	强致病性菌株 Pathoype	
18	Rs-T.1.3-010702-18	0.59	100.0	强致病性菌株 Pathoype	
19	Rs-T.1.3-010702-19	0.48	100.0	强致病性菌株 Pathoype	
20	Rs-T.1.3-010702-20	0.58	100.0	强致病性菌株 Pathoype	
21	Rs-T.1.3-010702-21	0.48	100.0	强致病性菌株 Pathoype	
22	Rs-T.1.3-010702-22	0.60	100.0	过渡性菌株 Trans-pathotype	
23	Rs-T.1.3-010702-23	0.69	96.7	过渡性菌株 Trans-pathotype	
24	Rs-T.1.3-010702-24	0.67	83.3	过渡性菌株 Trans-pathotype	
25	Rs-T.1.3-010702-25	0.37	100.0	强致病性菌株 Pathoype	
26	Rs-T.1.3-010702-26	0.92	0.0	无致病性菌株 Non-pathotype	
27	Rs-T.1.3-010702-27	0.45	100.0	强致病性菌株 Pathoype	
28	Rs-T.1.3-010702-28	0.80	66.7	过渡性菌株 Trans-pathotype	
29	Rs-T.1.1-010615-01	0.69	86.7	过渡性菌株 Trans-pathotype	
30	Rs-T.1.2-010618-01	0.50	100.0	强致病性菌株 Pathoype	
31	Rs-P.1.4-010704-01	0.78	30.0	过渡性菌株 Trans-pathotype	
32	Rs-P.1.4-010704-02	0.56	100.0	强致病性菌株 Pathoype	
33	Rs-G.1.4-010704-01	0.52	100.0	强致病性菌株 Pathoype	
34	Rs-G.1.4-010704-02	0.53	100.0	强致病性菌株 Pathoype	
35	Rs-E.1.3-010719-01	0.73	66.7	过渡性菌株 Trans-pathotype	
36	Rs-E.1.3-020626-02	0.57	100.0	强致病性菌株 Pathoype	
37	Rs-E.1.3-020626-03	0.44	100.0	强致病性菌株 Pathoype	
38	Rs-E.1.3-020626-04	0.50	100.0	强致病性菌株 Pathoype	
39	Rs-E.1.3-010620-05	0.79	36.7	过渡性菌株 Trans-pathotype	
40	Rs-E.2.1-050914-01	0.78	10.0	过渡性菌株 Trans-pathotype	

分、细菌培养条件、细菌纯化、菌龄、色谱条件等试验条件进行标准化,否则会严重影响方法的准确度和

重复性。该技术已广泛应用于细菌鉴定^[19,26]和微生物多样性研究中^[27,28],但是对于同一种细菌脂肪酸多态

性的分析尚未见报道。

青枯雷尔氏菌是一个比较复杂的细菌,适应性强,寄主范围很广,可侵害 44 个科的 300 多种植物^[1],在寄主范围、地理分布、致病特征、流行特征、种下分化等方面存在较大的差异,具有明显的多态性。青枯雷尔氏菌脂肪酸的气相色谱显示青枯雷尔氏菌脂肪酸分布也存在着明显的多态性:同一寄主分离的青枯雷尔氏菌脂肪酸分布存在着明显的差异,不同寄主分离的青枯雷尔氏菌脂肪酸也存在着明显的不同。青枯雷尔氏菌脂肪酸的种类和主要脂肪酸的含量存在明显的差异。进一步表现了青枯雷尔氏菌的高度复杂性。青枯雷尔氏菌种下分化复杂,过去 40 年,生理小种和生化型的划分,提供了识别青枯雷尔氏菌的种下分化的主要方法,其它的用于种下分化的方法还有血清型、溶源型、致病型、基因型等等。根据青枯雷尔氏菌对鉴别寄主的反应不同,可以进行生理小种的划分;按对 3 种双糖(麦芽糖、乳糖和纤维二糖)和 3 种六碳醇(甘露醇、山梨醇和甜醇)的利用情况,可将青枯雷尔氏菌分为不同的生化型;根据青枯雷尔氏菌弱化指数的不同,可以分成不同的致病性菌株。本试验证实了青枯雷尔氏菌脂肪酸的多态性,因此可以对青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性进行聚类分析,分析青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性与上述 3 种种下分化方法之间的关系。

应用 LGS 软件对所检测的 40 株青枯雷尔氏菌脂肪酸进行聚类分析,取欧式距离为 6 时,可以分成 3 类,即 Group 1、Group 2 和 Group 3。表明气相色谱技术、MIS 数据分析系统以及 LGS 软件三者的结合,对青枯雷尔氏菌按脂肪酸多态性进行分类得以实现。如果知道青枯雷尔氏菌菌株的脂肪酸色谱图,根据青枯雷尔氏菌脂肪酸色谱图 3 类之间的区别,可以确定它属于哪一个类群:若青枯雷尔氏菌菌株脂肪酸在 C16:1 ω 7c/C15:0 ISO 2OH 和 C16:0 之间有一小的色谱峰,则说明它属于 Group 1,否则属于 Group 2 或 Group 3;如果是后者,再根据它的 C16:1 ω 7c/C15:0 ISO 2OH 和 C16:0 两者百分含量的高低进行判断,如果前者低于后者,则它属于 Group 1,否则属于 Group 2。由于该技术的快速性、准确性,并可通过计算机的运用使分类达到数据化、自动化,因此作为一种重要的化学分类依据应用在微生物的种下分类研究上是可行的。

青枯雷尔氏菌在自然状态下,由于菌株的混杂,致病力分化严重^[29],青枯雷尔氏菌致病性有明显的强

弱之分,强致病性菌株可引起作物发病,甚至死亡,弱致病性菌株对作物并没有危害。因此,如果青枯雷尔氏菌的种下分化能与其致病性存在着一定的相关性,这对进一步研究青枯雷尔氏菌的致病及其防治具有重要的意义。但是以往的种下分化方法并没有对致病力的分化起到划分作用。如林美琛^[24]在进行致病力测定时,发现同一生理小种对番茄的致病力表现不同;生化型则是根据青枯雷尔氏菌对糖和醇的利用情况进行划分,与其致病力的强弱没有直接的相关性^[11]。这些分类对研究青枯雷尔氏菌的防治造成了一定的不便。本研究表明,福建省的青枯雷尔氏菌生理小种 1 存在着不同的脂肪酸类群,其脂肪酸多态性与其生化型之间没有特定的相关性,而与其致病性之间存在着对应关系,这对于研究青枯病的防治具有重要的意义。根据脂肪酸可以区分青枯雷尔氏菌致病性的不同,但是脂肪酸是不是青枯雷尔氏菌的致病因子之一,有待进一步研究。综上所述,脂肪酸有望成为青枯雷尔氏菌小种鉴定的新指标,细菌脂肪酸作为化学分类法的依据,在细菌种下分类上将具有广阔的应用前景。

4 结论

4.1 青枯雷尔氏菌脂肪酸的气相色谱显示福建省青枯雷尔氏菌脂肪酸分布存在着明显的多态性:同一寄主分离的青枯雷尔氏菌脂肪酸分布存在着明显的差异,不同寄主分离的青枯雷尔氏菌脂肪酸也存在着明显的不同。

4.2 对 40 株青枯雷尔氏菌的脂肪酸进行聚类分析,可以分为 3 类,即 Group 1、Group 2 和 Group 3,根据青枯雷尔氏菌菌株脂肪酸色谱图的特征,可以确定它属于哪一类群。

4.3 福建省的青枯雷尔氏菌生理小种 1 存在着不同的脂肪酸类群,其脂肪酸多态性与其生化型之间没有特定的相关性,而与其致病性之间存在着一定的相关性:Group 1 为无致病性菌株,Group 2 为过渡性菌株,Group 3 为强致病性菌株。

4.4 研究青枯雷尔氏菌脂肪酸多态性,不仅为青枯雷尔氏菌以及其他细菌的种下分类提出了一种可行性的方法,而且对于青枯病的防治具有重要的意义。

References

- [1] Hayward A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 1991, 29: 65-87.

- [2] Dean W G, Caitilyn A, Mark S, Timothy P D, Jean T G, Duan Y P, et al. Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19 (1): 69-79.
- [3] Williamson L, Nakaho K, Hudelson B, Allen C. *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2 strains isolated from geranium are pathogenic on potato. *Plant Disease*, 2002, 86: 987-991.
- [4] 谢从华, 柳俊, 张克顺. 马铃薯块茎青枯病菌潜伏感染的酶联免疫学检测. *中国马铃薯*, 2000, 14(3): 131-134.
Xie C H, Liu J, Zhang K S. Detection of *Ralstonia solanacearum* in latently infected potato tubers by enzyme-linked immunosorbent assay. *China Potato*, 2000, 14(3): 131-134. (in Chinese)
- [5] 刘琼光, 曾宪明, 董春. 植物青枯病的血清分型研究. *华南农业大学学报*, 1997, 18(3): 33-37.
Liu Q G, Zeng X M, Dong C. The serotypes of bacterial wilt pathogen (*Pseudomonas solanacearum*) in plants. *Journal of South China Agricultural University*, 1997, 18(3): 33-37. (in Chinese)
- [6] Villa J, Tsuchiya K, Horita M, Natural M, Opina N, Hyakumachi M. DNA analysis of *Ralstonia solanacearum* and related bacteria based on 282 bp PCR-amplified fragment. *Plant Disease*, 2003, 87: 1337-1343.
- [7] Buddenhagen I W, Kennedy K R, Wang C H. Comparative carbohydrate catabolism in three different pathogenic strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 1966, 56: 999-1002.
- [8] 姚革, 彭化贤. 四川省细菌性青枯病原菌菌系及分布研究. *西南农业大学学报*, 1990, 12(5): 536-540.
Yao G, Peng H X. Study on the strains and distribution of bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) from Sichuan. *Journal of Southwest Agricultural University*, 1990, 12(5): 536-540. (in Chinese)
- [9] Diagnostic protocols for regulated pests: Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés-*Ralstonia solanacearum*. *OEPP/EPPO, Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 2004, 34: 173-178.
- [10] 刘波, 林营志, 朱育菁, 曹宜, 肖荣凤, 葛慈斌. 青枯雷尔氏菌多态性研究. 福州: 福建科学技术出版社, 2005: 84-85.
Liu B, Lin Y Z, Zhu Y J, Cao Y, Xiao R F, Ge C B. *Study on Polymorphism of Ralstonia solanacearum*. Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 2005: 84-85. (in Chinese)
- [11] 王国平, 罗宽, 廖晓兰, 周志成, 彭朝晖. 湖南烟草青枯病菌的致病性及和生物型研究. *湖南农业大学学报*, 1996, 22(4): 371-374.
Wang G P, Luo K, Liao X L, Zhou Z C, Peng Z H. Studies on the *Pseudomonas solanacearum* pathogenicity and biotype of the tobaccos in Hunan Province. *Journal of Hunan Agricultural University*, 1996, 22(4): 371-374. (in Chinese)
- [12] 卢同, 种藏文, 王长方, 李怡英, 吴平, 程由铨. 甘薯青枯病菌单克隆抗体的分类及其血清型研究. *福建省农科院学报*, 1997, 12(2): 19-23.
Lu T, Zhong Z W, Wang C F, Li Y Y, Wu P, Cheng Y Q. Studies on classification and antiseroypes of monoclonal antibodies against *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Fujian Academy of Agriculture Sciences*, 1997, 12(2): 19-23. (in Chinese)
- [13] Horita M, Tsuchiya K. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. *Bacteriology*, 2001, 91(4): 399-407.
- [14] Yu Q, Alvarez A M, Moore P H, Zee F, Kim M S, de Silva A, Hepperly P R, Ming R. Molecular diversity of *Ralstonia solanacearum* isolated from ginger in Hawaii. *Bacteriology*, 2003, 93(9): 1124-1130.
- [15] 张国赏, 吴文娟, 潘仁瑞. 气相色谱-质谱法检测细胞脂肪酸及其在细菌鉴定上的应用. *合肥联合大学学报*, 2000, 10(4): 92-96.
Zhang G S, Wu W J, Pan R R. Determination of fatty acids in cells by GC-MS and Its application in bacterium identification. *Journal of Hefei Union University*, 2000, 10(4): 92-96. (in Chinese)
- [16] Merry S R, Vaughn S C, Richard E L, Larry F, Terence L M. Rapid phenotypic change and diversification of a soil bacterium during 1000 generations of experimental evolution. *Microbiology*, 2001, 147: 995-1006.
- [17] 刘志辉, 蔡杏珊, 竺彭波, 关平, 许婉华, 吴龙章. 应用气相色谱技术分子全细胞脂肪酸快速鉴定分枝杆菌. *中华结核和呼吸杂志*, 2005, 28(6): 403-406.
Liu Z H, Cai X S, Zhu P B, Guan P, Xu W H, Wu L Z. Study on species identification of *Mycobacteria* by gas chromatography analysis of whole-cell fatty acid. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 2005, 28(6): 403-406. (in Chinese)
- [18] Ozbek A, Aktas O. Identification of three strains of *Mycobacterium* species isolated from clinical samples using fatty acid methyl ester profiling. *The Journal International Medical Research*, 2003, 31: 133-140.
- [19] Muller K, Schmid E N, Kroppenstedt R M. Improved identification of mycobacteria by the microbial identification system in combination with additional trimethylsulfonium hydroxide pyrolysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36: 2477-2480.
- [20] Basile F, Voorhies K J, Hattfield T L. Microorganism gram-type differentiation based on pyrolysis-massspectrometry of bacterial fatty acid methyl ester extracts. *Applied Environmental Microbiology*, 1995, 61(4): 1534-1539.
- [21] 方中达. 植病研究方法. 北京: 中国农业出版社, 1996: 182-183.
Fang Z D. *Methods of Plant Pathology Research*. Beijing: Chinese

- Agriculture Press, 1996:182-183. (in Chinese)
- [22] 陈晓敏, 胡方平, 吴燕榕. 福建省花生青枯病菌致病型及生物型的测定. 福建农业大学学报, 2000, 29(4): 470-473.
- Chen X M, Hu F P, Wu Y R. Pathotypes and biotypes of *Ralstonia solanacearum* isolated from bacterial wilt of peanut in Fujian Province. *Journal of Fujian Agricultural University*, 2000, 29(4): 470-473. (in Chinese)
- [23] 刘波, 林营志, 朱育菁, 葛慈斌, 曹宜. 生防菌对青枯雷尔氏菌的致弱特性. 农业生物技术学报, 2004, 12(3): 322-329.
- Liu B, Lin Y Z, Zhu Y J, Ge C B, Cao Y. Attenuation characteristics of bacterial-wilt-disease biocontrol strain anti-8098A (*Bacillus cereus*) to *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2004, 12(3): 322-329. (in Chinese)
- [24] 林美琛, 陈华平, 陆民强, 杨海明. 番茄青枯病菌生化型及其分布的研究. 浙江农业学报, 1993, 5(1):62-64.
- Lin M C, Chen H P, Lu M Q, Yang H M. Biotypes of *Pseudomonas solanacearum* and its distribution on tomato. *Acta Agricultural Zhejiangensis*, 1993, 5(1):62-64. (in Chinese)
- [25] 张长岭, 华静月, 王东, 郑宏启. 青枯菌的菌种保存. 植物保护, 1993, 19(1): 39-40.
- Zhang C L, Hua J Y, Wang D, Zheng H Q. Protection strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Protection*, 1993, 19(1): 39-40. (in Chinese)
- [26] 吴愉萍, 徐建明, 汪海珍, 胡宝兰, 吴建军. Sherlock MIS 系统应用于土壤细菌鉴定的研究. 土壤学报, 2006, 43(4): 642-647.
- Wu Y P, Xu J M, Wang H Z, Hu B L, Wu J J. Application of Sherlock MIS in identification of soil bacteria. *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(4): 642-647. (in Chinese)
- [27] Amrit K, Chaudhary A, Amarjeet K, Choudhary R, Karshic R. Phospholipid fatty acid—a bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science*, 2005, 89(7): 1103-1112.
- [28] Salomonová S, Lamačová J, Rulík M, Rolčík J, Čápa L, Bednář P, Barták P. Determination of phospholipid fatty acids in sediments. *Facultas Rerum Naturalium*, 2003, 42:39-49.
- [29] 帅正彬, 苏家烈, 罗小波. 成都番茄青枯菌生理分化和品种抗性鉴定. 中国蔬菜, 1997, (3):16-18.
- Shuai Z B, Su J L, Luo X B. Physiological specialization of tomato bacterial wilt pathogen (*Pseudomonas solanacearum* Smith) in Chengdu and identification of the resistance of tomato varieties. *China Vegetables*, 1997, (3):16-18. (in Chinese)

(责任编辑 王红艳)