

玉米细菌性枯萎病选择性培养基——黑色素培养基

郭翼奋 梁再群

俞大绂

(中国农业科学院植物保护研究所, 北京)

(北京农业大学, 北京)

鉴于我国没有玉米细菌性枯萎病, 这个选择性培养基是为从进口玉米中直接分离该病原细菌而设计的。与其它选择性培养基比较, 黑色素培养基的平板效率较高, 菌落的特异性显著, 容易判断。很多腐生细菌和其它病原细菌以及真菌, 在这种培养基上不生长或生长受到严重抑制或仅有部分生长。

我国对外植物检疫对象——玉米细菌性枯萎病病原菌 [*Erwinia stewartii* (E. F. Sm.) Dye] 的检验是口岸急需解决的一个检疫技术课题。而选择性培养基又是植物病原细菌检验技术的重要问题之一。为设计一种分离检验该菌具有更高性能的选择性培养基, 进行了玉米枯萎病选择性培养基比较试验。

材 料 和 方 法

(一) 菌种来源

玉米细菌性枯萎病菌, 即斯氏欧文氏菌 [*Erwinia stewartii* (E. F. Sm) Dye] 编号 8199 和 8200, 引自美国标准菌种保藏委员会 (American Type Culture Collection)。根据玉米植株测定证明^[1], 8199 菌株为强毒系, 8200 为弱毒系菌株。

其它植物病原细菌: *Agrobacterium radiobacter*, *Corynebacterium simplex*, *Erwinia aroideae*, *E. carotovora* 由中国科学院微生物所提供; *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Ps. solanacearum*, *Ps. batatae*, *Xanthomonas campestris*, *X. atrofaciens*, *X. oryzae*, *X. malvacearum* 等是我所植物细菌病害研究组、大田药效研究组提供的。同时还用伊凡诺夫培养基, 从进口玉米种子上分离的与玉米枯萎病细菌相似的黄色细菌, 如 *Erwinia herbicola* 即 *Enterobacter agglomeratus* 等; 也测定了若干种腐生细菌。

(二) 选择性培养基

在进行培养基、抗生素、染色剂筛选的基础上, 选用了五种对玉米枯萎病细菌生长较好的培养基进行比较试验 (下列每种培养基中均加入制霉菌素 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1% 黑色素 20 ml):

1. 黑色素培养基: 牛胆酸钠 3g, NaCl 15g, 酵母膏 1g, 甘油 30 ml , 琼脂 17g, 蒸馏水 1000 ml ^[2,3]。

2. 酵母陈培养基: 酵母膏 5g, 蛋白胨 1g, 葡萄糖 10g, 琼脂 17g, 蒸馏水 1000 ml 。

3. 酵母硫酸镁培养基: 牛胆酸钠 3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, 酵母膏 1g, KH_2PO_4 0.5g, 甘油 30 ml , NaCl 15g, 琼脂 17g, 蒸馏水 1000 ml 。

4. 改订 Wilbrink 培养基: 蔗糖 10g, 蛋白胨 5g, 磷酸氢二钾 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25g, 无水亚硫酸钠 0.05g, 琼脂 17g, 蒸馏水 1000 ml 。

5. 伊凡诺夫培养基: 是玉米枯萎病细菌的一种选择性培养基^[2,4,5] (作对照)。

6. Wilbrink 培养基: (不加黑色素、制霉菌素) 是多数细菌能生长的培养基^[3] (作对照)。

(三) 不同组合培养基效果比较试验

用 8199 和 8200 菌系与玉米种子上常见腐生细菌、真菌混合, 配制孢子悬浮液进行稀释涂抹培养; 不同组合培养基对各种细菌选择性能比较试验, 主要用诱发植物病害等五个属的 17 个菌系, 采用单菌划线测定。

本文于 1981 年 2 月 19 日收到。

试验结果

(一) 不同组合培养基的玉米枯萎病菌落形态特征和抗真菌效果比较

试验表明,各种组合培养基虽然都加入制霉菌素,抑制真菌效果却完全不同。黑色素培养基、酵母硫酸镁培养基全无真

菌生长;酵母胨培养基与伊凡诺夫培养基、Wilbrink 培养基都有大量真菌生长,把细菌覆盖;改订 Wilbrink 培养基三天后也开始长真菌(表 1)。

各种组合培养基加入水溶黑色素后,基质都是紫黑色,但玉米枯萎病细菌在吸收黑色素的能力以及菌落形态特征方面,

表 1 不同选择性培养基对玉米枯萎病菌菌落形态特征的影响和抗真菌效果
Table 1 Effect of different selective media on the morphological characters of *E. stewartii* and anti-fungi ability

培养特征 Cultural character 培养基 Medium	菌株 Strains	8199 菌系 <i>E. stewartii</i> 8199	8200 菌系 <i>E. stewartii</i> 8200	真菌生长情况 Growth of fungi
黑色素培养基 Nigrosine medium (NM)		菌落直径 12mm,中心黑色,边缘透明,表面光滑、闪光、粘性 Colonies 12mm in diameter, black-pigmented center, transparent brim, smooth and glistening surface and viscid	菌落直径 5mm,中心黑色,边缘透明,表面光滑、闪光、粘性 Colonies 5mm in diameter, black-pigmented center, transparent brim, smooth and glistening surface and viscid	无 No growth
酵母胨培养基 Yeast-peptone medium (modified)		菌落直径 8mm,稍凸,粘性,后期干燥,中心和边缘稍凸,在中心和边缘之间,间有个浅色环带 Colonies 8mm in diameter, slightly convex, viscid, later stage dry; center and brim convex; moderately pigmented zonate in between center and brim	菌落直径 2mm,全黑色 Colonies 2mm in diameter, entirely black,	琼脂平板大部分被真菌所覆盖 A great portion of the agar plate covered by fungi
酵母硫酸镁培养基 Yeast-magnesium sulfate medium		菌落直径 12.5mm,中心黑色,边缘透明,表面光滑,闪光,粘性 Colonies 12.5mm in diameter black center, transparent brim, smooth and glistening surface and viscid	菌落直径 5mm,中心黑色,边缘透明,表面光滑,闪光,粘性 Colonies 5mm in diameter black center, transparent brim, smooth and glistening surface and viscid	无 No growth
改订 Wilbrink 培养基 Wilbrink medium (modified)		菌落直径 12mm,无色透明表面光滑闪光和粘性 Colonies 12mm in diameter, colourless transparent, smooth and glistening surface and viscid	菌落直径 5mm,无色透明表面光滑闪光,粘性。 Colonies 5mm in diameter, colourless transparent, smooth and glistening surface and viscid	三天后有少许真菌出现 Three days later slight growth of fungi appeared
Wilbrink 培养基 Wilbrink medium		菌落直径 12.5mm,淡乳白色,表面光滑,闪光,粘性 Colonies 12.5mm in diameter, pale milk white, smooth and glistening surface and viscid	菌落直径 5mm,无色透明,表面光滑闪光粘性 Colonies 5mm in diameter, pale milk white, smooth and glistening surface and viscid	琼脂平板大部分被真菌所覆盖 A great portion of the agar plate covered by fungi
伊凡诺夫培养基(对照) Ivanoff medium		菌落直径 10mm 橄榄黄表面光滑,闪光粘性 Colonies 10mm in diameter pale olive yellow, smooth and glistening surface and viscid	菌落直径 3mm,淡桔黄色,表面光滑,闪光,粘性 Colonies 3mm in diameter pale orange colour, smooth and glistening surface and viscid	同上 Do

表 2 不同选择性培养基选择性性能比较

Table 2 Comparison of selective efficiency of different selective media

抑制效果 Inhibitive effect	培养基 Medium	黑色素培养基 Nigrosine medium (NM)	酵母胨培养基 Yeast-peptone medium (modified)	酵母硫酸铵培养基 Yeast-magnesium sulfate medium	改订 Wilbrink 培养基 Wilbrink medium (modified)	伊凡诺夫培养基 Ivanoff medium	Wilbrink 培养基 Wilbrink medium
细菌 Bacteria							
	<i>E. stewartii</i> 8199	++++*	+++	++++	+++	++++	++++
	<i>E. stewartii</i> 8200	++++	+++	++++	+++	++++	++++
	<i>E. aroidae</i>	++	+++	++	+	++++	++++
	<i>P. carotovora</i>	+++	+++	+++	+++	++++	++++
	<i>B. herbicola</i> **	++	+++	+++	+++	++++	++++
	<i>A. tumefaciens</i>	—	+++	+	+++	—	+++
	<i>A. radiobacter</i>	+++	+++	+++	+++	++++	+++
	<i>P. syringae</i>	+++	+++	++	+++	+++	+++
	<i>P. solanacearum</i>	—	+++	—	+++	—	+++
	<i>P. batatae</i>	—	+++	—	+++	—	+++
	<i>P. solanacearum</i>	—	++	++	+++	++	+++
	<i>X. malvacearum</i>	+	+++	—	+++	++	+++
	<i>X. atrofaciens</i>	—	+++	—	+++	—	+++
	<i>X. campestris</i>	+	+++	+	+++	—	+++
	<i>X. campestris</i>	—	+++	++	+++	—	+++
	<i>X. oryzae</i> OS-21	—	+++	—	+++	—	+++
	<i>C. simplex</i>	++	+++	+++	+++	+++	+++

* +++ 生长旺盛 ++ 生长中等 + 生长微弱 — 不生长
Growth luxuriant Growth moderate Growth weak No growth

** 玉米种子上常见腐生细菌之一
The common saprophytic bacteria on the corn seed.

不同培养基的反应也各不相同。如黑色素培养基、酵母硫酸镁培养基, 8199 和 8200 菌系的菌落形态特征较一致, 菌落中心黑色, 边缘透明, 细菌生长旺盛。而 8199 和 8200 菌系在酵母胨培养基上却表现各不相同的反应, 前者菌落开始油质, 后期形成干燥的菌落, 呈同心圆, 中心和边缘黑色, 中间间有浅色环带, 后者菌落全黑色; 改订 Wilbrink 培养基: 8199 产生无色透明的油质菌落, 8200 菌系则产生无色或微黄色的透明菌落, 两者有细微差异。无论酵母胨培养基, 改订 Wilbrink 培养基在不同批次试验中, 形态特征稍有变化。在 Wilbrink 培养基上, 菌落呈淡乳白色。

(二) 不同组合培养基对各种细菌选择性能比较

从表 2 可看出, 不同培养基对各种细菌的选择性能是不同的。在黑色素培养基、伊凡诺夫培养基上, 被测 17 个菌系中, 8199 和 8200 菌系生长旺盛, 抑制其他细菌效果比别的培养基都好, 选择性能高; 酵母硫酸镁培养基尽管抑制真菌效果好, 8199 和 8200 菌系菌落形态具有同一的形态特征, 但抑制腐生细菌效果却没有黑色素培养基好; 酵母胨培养基, 改订 Wilbrink 培养基抑菌效果差, 除有个别细菌生长不好外, 一般生长良好, Wilbrink 培养基所测 17 个菌系都生长旺盛。表明后三种培养基不宜做玉米枯萎病菌的选择性培养基。

从各种细菌形态特征观察来看, 在黑色素培养基、酵母硫酸镁培养基上, 8199 和 8200 菌系, 都具同样的形态特征, 与其他菌分辨能力较高。虽然被测菌中 *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas syringae* 与 8199、8200 菌的菌落形态有些类似, 但这两种菌的菌落都呈中心灰黑色, 边缘银鼠灰, 覆轮状, 无粘性, 显然有别于玉米枯萎病菌。此外, 从伊凡诺夫培养基分离到

的与玉米枯萎菌相似的黄色油质腐生细菌, 包括 *Erwinia herbicola* 等菌, 均不呈现玉米枯萎病细菌具有代表性中心黑色和边缘透明的菌落。

讨 论

伊凡诺夫曾设计一种自残株病土分离玉米枯萎病菌的选择性培养基^[6-7]。我们采用这个培养基作种子带菌分离检验, 发现它对真菌无抑制作用, 往往由于真菌迅速生长, 容易把病原细菌覆盖, 影响细菌菌落的检查, 同时选择玉米细菌性枯萎病菌落的准确性较差, 种子上沾染的细菌有些能在上面生长, 特别是发育成黄色油质的杂菌菌落存在时, 不易辨认。

实践证明, 黑色素培养基作为玉米细菌性枯萎病菌的选择性培养基, 其选择性能较高, 是分离、检验和鉴定该菌较理想的培养基。其成分如下: 酵母浸膏 1g; 甘油 30ml; 制霉菌素 200 μ g/ml; 牛胆酸钠 3g; NaCl 15 克; 1% 水溶黑色素 20ml; 琼脂 17g; 蒸馏水 1000ml。该培养基中含有牛胆酸钠, 能够抑制部分格兰氏阳性和阴性细菌; 并利用玉米枯萎病菌耐盐的特点, 加大了氯化钠的用量, 可抑制部分不耐盐细菌; 甘油是很多细菌的不良碳源, 因此, 用甘油作为碳源是合适的; 制霉菌素抑制真菌效果较好, 7—15 天琼脂平板不长真菌; 选用水溶黑色素作为培养基成分, 可促使菌落形成特异征状, 有利于分离、检验和鉴定。

制备黑色素培养基首先要注意培养基 pH 的调整, (一般 pH6.7)。制霉菌素黑色素应在培养基灭菌后加入为宜。

玉米枯萎病菌在黑色素培养基上, 30 $^{\circ}$ C 恒温培养 24—36 小时, 开始形成菌落, 在形成过程中 (5—7 天), 由于细菌吸收黑色素, 使菌落中心对光透视呈黑色, 边

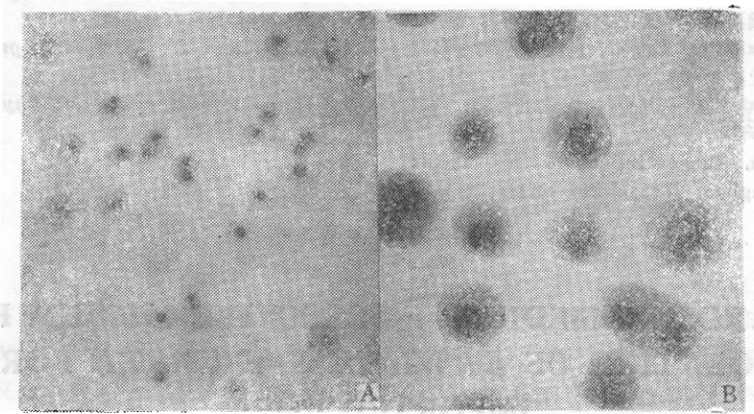


图1 玉米枯萎病菌在黑色素培养基上的菌落形态特征(同一培养时间)

A. 8199 菌系 B. 8200 菌系

Fig. 1 Comparison of cultural characteristics between strains of *E. stewartii*

A. 8199 strain B. 8200 strain

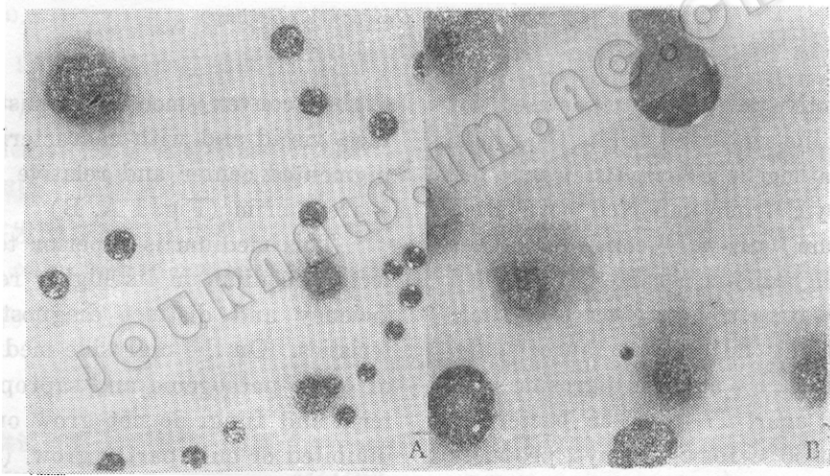


图2 带菌玉米种子在黑色素培养基上的分离培养结果

Fig. 2 Result of isolating *E. stewartii* 8199 strain from carrier corn seed, on the nigrosine selective medium

缘形成透明圈,菌落圆形,边缘整齐,稍凸,表面光滑,闪光,呈粘液状,两个菌系菌落形态具有共同的特异性,唯有菌落大小的差别,培养5—7天后,8199菌落直径12—15毫米,8200菌系直径3—5毫米,如图1。

黑色素培养基选择性能较高,种子(杂菌较少情况下)不经表面消毒可直接用于稀释分离培养,即使菌量较低,也能查到玉

米枯萎病细菌,其他细菌种群仅有一部分能在上面生长外,很多细菌不能在这个培养基上生长,或细菌生长受到严重抑制,如图2。

黑色素培养基经多次玉米低菌量检测,其阳性率高于同类选择性培养基。

参 考 文 献

- [1] 郭翼奋、梁再群、俞大骏: 科学通报, 26(5):

- 630, 1981。
- [2] 郭翼奋、梁再群: 植物保护, 7(4): 25, 1981。
- [3] 俞大绂: 《植物病理学和真菌技术汇编》, 高等教育出版社, 第408、427页, 1959。
- [4] 方中达: 《植病研究方法》, 农业出版社, 第90页, 1979年。
- [5] Guo Yifen, Liang Zaiqun & Yu Dafu: Kexue Tongbao, 27(2): 207—208, 1981。
- [6] Ivanoff, S. S.: Jour. Agr. Research, 47: 749, 1933.
- [7] Ivanoff, S. S.: Jour. Agr. Research, 60: 217—239, 1935.
- [8] Spencer, E. L. et al.: Phytopathology, 28: 213—223, 1938.

NIGROSINE MEDIUM—SELECTIVE MEDIUM FOR ISOLATION OF *ERWINIA STEWARTII* FROM IMPORTED CORN

Guo Yifen

Liang Zaiqun

(Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

Yu Dafu

(Beijing Agricultural University, Beijing)

A selective medium was devised for the quarantine service to isolate the causal bacterial pathogene *Erwinia stewartii* (E. F. Sm). Dye, from imported corn seed. This medium (pH 6.7) consisted of the following ingredients per liter of distilled water; yeastextract, 1 g; glycerol, 30 ml; nystatin, 200 μ g/ml; sodium taurocholate, 3 g; NaCl, 15 g; 1% aqueous nigrosine solution, 20 ml; agar, 17 g. The bacterium incubated at 30°C for 5—7 days, produces colonies which are roughly circular, entire,

slightly convex, smooth and glistening surface, viscid and with characteristic black-pigmented center and relative wide transparent brim (Fig. 1 A, B)

This medium is superior to other selective medium in its higher recovery efficiency and distinct diagnostic characteristics. On the nigrosine medium, much of other pathogenic and saprophytic bacteria and fungi do not grow or seriously inhibited or only partly grow. (Fig. 2).