

云南马铃薯细菌性软腐病原菌的分离鉴定*

赵志坚¹, 王淑芬¹, 方琦², 李先平², 何云昆²

(1. 云南省农业科学院植物保护研究所, 云南 昆明 650205;

2. 云南省农业科学院生物技术研究所, 云南 昆明 650223)

摘要: 从云南省马铃薯产区取样, 用厌氧技术分离纯化 42 个软腐欧文氏杆菌菌株。根据品种差异代表性选出 20 个菌株进行主要细菌学性状鉴定, 并在此基础上进行分类。结果表明: 13 个菌株(占 65%)是 *Erwinia carotovora* var. *carotovora*, 3 个菌株(15%)是 *Erwinia chrysanthemi*, 其它 4 个菌株根据其生理生化特性划归为中间型, 介于 *Erwinia carotovora* var. *carotovora* 和 *Erwinia chrysanthemi* 之间。

关键词: 马铃薯; 细菌性软腐病; 欧文氏杆菌

中图分类号: S 435.32(274) **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2000)04-0324-03

马铃薯细菌性软腐病是国内外马铃薯产区发生很普遍的重要病害之一, 主要发生在贮藏期和收获后的运输过程中。据国外资料报道, 损失率为 3%~68%, 平均 15%^[1], 在我国南方的一些省区因此病造成的块茎损失有时可高达 30%~50%, 而且在大田生长期常引起烂种和死芽死苗, 严重时可导致缺苗断垄^[2]。目前的马铃薯栽培品种中缺乏对该病害的抗源, 常规育种收效甚微, 因此基因工程可能为选育抗细菌病害新品种提供了一个良好的途径^[3]。

引起马铃薯软腐的软腐欧文氏杆菌有胡萝卜软腐欧文氏杆菌黑胫亚种 [*Erwinia carotovora* var. *atroseptica* (Van hall) Dye]、胡萝卜软腐欧文氏杆菌胡萝卜亚种 (*Erwinia carotovora* var. *carotovora* Dye) 和菊欧文氏杆菌 (*Erwinia chrysanthemi* Burkholder et al.)^[2,4,5], 但有关这 3 种病原菌在云南省的组成情况还不清楚。为了有的放矢地对马铃薯基因工程材料进行抗病性评价, 我们对云南的马铃薯软腐病原菌进行了分离、鉴定。

1 材料和方法

1.1 供试材料

从云南省马铃薯产区收集米拉、会顺 88,

I-1085, 中甸红、川芋 56 等品种的块茎为供试材料。

1.2 菌株的分离纯化

用于分离、纯化的培养基为结晶紫果胶酸钠(简称 CVP)琼脂培养基和牛肉膏蛋白胨葡萄糖(简称 BPG)培养基^[6,7]。参考王金生等^[8]描述的方法, 将供试材料进行厌氧技术处理 3~4 d 后, 分别从不同品种的带病块茎上挑取菌脓于 CVP 琼脂培养基平板上划线 28℃ 培养, 待长出菌落后, 挑取具典型特征的菌落^[7]在 BPG 琼脂培养基上进行多次纯化。从供试材料上共分离得 42 个菌株, 所有菌株的纯培养于甘油悬液中 -70℃ 冷冻保存。

1.3 致病性测定

所有菌株的致病性测定是按 Lapwood, D. H.^[5], 王金生等^[9]描述的新鲜薯片接种法和整薯块刺伤接种法进行的。接种后的薯片和整薯保湿置于 28~30℃ 培养箱内, 观察记录发病情况。

1.4 鞭毛观察

将供试菌株 28℃ 于 BPG 琼脂培养基上培养 24 h 至对数生长期, 负染法处理制片, 电子显微镜下观察鞭毛的有无及着生方式并摄影。

1.5 生理生化鉴定

从分离的 42 个菌株中, 按所属品种代表性选出 20 个菌株进行细菌学特征鉴定。革兰氏染

* 收稿日期: 1999-11-23

基金项目: 云南省“九五”重点科技攻关项目(95A8-1)

作者简介: 赵志坚(1972-), 男, 云南昭通人, 助理研究员, 主要从事植物病理学方面的研究。

色、CVP培养基上溶果胶能力、D-1琼脂上生长、King'B培养基上不产生荧光色素、碳水化合物代谢发酵型、对红霉素敏感性、氧化酶、36℃和39.5℃下生长、5% NaCl中生长、吡啶产生、明胶液化、葡萄糖氧化产气、从蔗糖产生还原物质、乳糖、麦芽糖、海藻糖产酸等主要生理生化特性按王金生等^[6,8,10,11]进行。

附表 云南分离的马铃薯软腐欧氏杆菌的主要细菌学特征

Tab. Main bacteriological characters of potato soft rot *Erwinia* spp. isolated from Yunnan

主要细菌学性状	胡萝卜软腐 欧氏杆菌 胡萝卜亚种 Ecc(13株)	菊欧文 氏菌 Echr (3株)	中间型 (4株)
	周生鞭毛	周生鞭毛	周生鞭毛
革兰氏染色	-	-	-
鞭毛	周生鞭毛	周生鞭毛	周生鞭毛
溶果胶物质	+	+	+
D-1琼脂上生长	+	+	+
厌氧生长	+	+	+
马铃薯软腐	+	+	+
King'B培养基产生荧光	-	-	-
对红霉素的敏感性	-	+	-
氧化酶	-	-	-
36℃生长	+	+	+
39.5℃生长	+	+	+
5% NaCl生长	+	+	+
吡啶产生	-	+	-
明胶液化	+	+	+
葡萄糖氧化产气	+	+	+
从蔗糖产生还原物质	-	+ (66.7%)	+
乳糖产酸	+	+	+
麦芽糖产酸	+	+	+
海藻糖产酸	+	+	+

注：“+”阳性反应，“-”阴性反应

2 结果与分析

2.1 菌落培养特征

所有软腐欧氏杆菌均能在 CVP 琼脂培养基上形成半透明形式的菌落,产生很深的、杯状的凹陷特征;在 BPG 琼脂平板上生长的菌落则呈白色或污白色,圆形凸起,边缘整齐、质地粘稠。

2.2 致病性测定

所有分离的菌株均能引起马铃薯新鲜薯片和整薯软腐。一般接种 24 h 后开始出现病症,块茎接种点组织变灰,72 h 后病症明显,块茎组织变软、变稀,呈湿腐状,病组织与健组织界限分明,通常在病区边缘呈灰褐色或黑色。

2.3 软腐欧氏杆菌的鉴定

供试菌株革兰氏染色反应均为阴性,电子显微镜下观察为菌体杆状,鞭毛周生 4~8 根,其它重要生理生化鉴定结果见表 1。经鉴定的 20 个云南分离菌株分属于 2 个不同的种或亚种,一个中间型。属于 *E. carotovora* var. *carotovora* (Ecc) 的有 13 个菌株,占 65%,*E. chrysanthemi* (Echr) 3 个菌株,占 15%,其余 4 个菌株相对 Ecc 而言,其所测生理生化特征除从蔗糖产生还原物质反应阳性外,其余均与 Ecc 相同;但相对 Echr 而言,其所测生理生化特征除对红霉素敏感性反应阳性、吡啶产生阴性外,其余特征均与 Echr 相同,故划归为中间型,介于 Ecc 与 Echr 之间(但更偏向于 Ecc)。同时从表中可看出,引起云南马铃薯软腐的主要欧氏杆菌为胡萝卜软腐欧氏杆菌胡萝卜亚种(Ecc),已鉴定的菌株中,没有分离到胡萝卜软腐欧氏杆菌黑胫亚种(Eca)。

3 讨论

引起马铃薯腐烂的软腐欧氏杆菌中,不同国家和地区报道的种类有所不同^[2,4,5,10,12],80 年代中期,王金生等曾报道马铃薯软腐欧氏杆菌 Eca, Ecc 和 Echr 在我国的组成及分布,发现在送测样本的所有省区均有 Ecc 分布(未包括云南),284 个菌株中,Ecc 占 72.5%,为优势病原菌;Eca 占 5.3%,主要集中在分布于我国北方地区,并且分离到中间型 I 和中间型 II 菌株^[8]。

本研究以云南省马铃薯产区取样分离鉴定的结果表明:引起云南马铃薯软腐的欧氏杆菌有 Ecc, Echr 及一个中间型,其中 Ecc 为优势侵染病原菌,占 65%,在供试的所有马铃薯品种上广泛分布,说明可通过伤口、气孔或皮孔侵入寄主的该病原菌对马铃薯的不同品种无明显特异性,均可引起马铃薯致病。在自然情况下,只有少数报道发现 Echr 危害马铃薯^[4,10,13],本研究证实 Echr 在云南也有发生。鉴定的菌株中,没有发现 Eca,可能与 Eca 主要分布于我国北方地区有关。同时,从云南分离到的 Ecc 和 Echr,在一些生理生化反应上与已报道的菌株有明显差异^[4,8,10,11],如:报道的 Ecc 90% 的菌株在 39.5℃ 下不生长;Ecc, Echr 和两种中间型大部分菌株从葡萄糖氧化产气反应为阴性;Ecc 和 Echr 93% 以上的菌株麦芽糖产酸反应为阴性,而从云南分离的 Ecc, Echr 和中间型菌株,在这

些反应上几乎全部为阳性反应,另一方面,4 个划归为介于 Ecc 和 Echr 之间的中间型菌株与王金生等报道的中间型 I 和中间型 II 均不同。这些差异说明软腐欧氏杆菌的命名种或亚种各菌株的一些生理生化性状是不稳定的,可能与它们分布的具体生境相关。

根据 Ecc 为云南马铃薯细菌性软腐优势病原菌这一结果,我们将主要用 Ecc 对马铃薯转基因材料进行抗病性评价。同时,应该指出的是:本研究分离鉴定的菌株,受样本数量和鉴定菌株数量的限制,所得的结果是否具有代表性仍值得作进一步的研究。

[参 考 文 献]

- [1] LUND M B. Bacteria soft rot of potatoes in : Plant Pathogens (Lovelock D W Ed)[M]. New York: New York Academic Press, 1979. 24 - 29.
- [2] 黑龙江省农业科学院马铃薯研究所主编. 中国马铃薯栽培学[M]. 北京:中国农业出版社, 1994. 327 - 331.
- [3] 屈贤铭, 贾士荣. 抗菌肽在植物基因工程中的应用. 见:贾士荣, 屈贤铭主编. 马铃薯抗菌肽基因工程[A]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996. 14 - 31.
- [4] COTHER E J, POWELL V. Physiological and pathological characteristics of *Erwinia chrysanthemi* isolates from potato tubers[J]. Journal of applied Bacteriology, 1983, 54: 37 - 43.
- [5] LAPWOOD D H, READ P T, SPOKES J. Methods for assessing the susceptibility of potato tubers of different cultivars to rotting by *Erwinia carotovora* subspecies *atroseptica* and *carotovora*[J]. Plant Pathology, 1984, 33: 13 - 20.
- [6] 方中达. 植病研究方法(第三版)[M]. 北京:中国农业出版社, 1998. 162 - 164.
- [7] CUPPELS D, KELMAN A. Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue[J]. Phytopathology, 1974, 64: 468 - 475.
- [8] 王金生, 韦忠民, 方中达. 马铃薯软腐细菌的鉴定[J]. 植物病理学报, 1985, 15: 25 - 30.
- [9] 王金生, 张学君, 方中达. 马铃薯块茎对软腐病抗性的评价方法及我国部分地区主要马铃薯品种的反应[J]. 中国农业科学, 1986, (3):45 - 50.
- [10] DICKEY R S. *Erwinia chrysanthemi*: a comparative study of phenotypic properties of strains from several hosts and other *Erwinia* species[J]. Phytopathology, 1979, 69: 324 - 329.
- [11] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984. 462 - 466.
- [12] DEBOER S H, KELMAN A. Evaluation of procedures for detection of pectolytic *Erwinia* spp. on potato tubers[J]. American Potato Journal, 1975, 52:117 - 123.
- [13] DELINDO L, FRENCH E R, KELMAN A. *Erwinia* spp. pathogenic to potatoes in Peru[J]. American Potato Journal, 1978, 55:383.

Isolation and Determination of Bacterial Soft Rot Pathogens from Potato Tubers in Yunnan

ZHAO Zhi-jian¹, WANG Shu-fen¹, FANG Qi², LI Xian-ping², HE Yun-kun²

(1. Institute of Plant Protection, Yunnan Academy of Agricultural Science, Kunming 650205, China;

2. Institute of Biotechnology, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China)

Abstract: From the potato tubers in Yunnan, 42 soft rot *Erwinia* strains were isolated and purified by using anaerobic method. Main bacteriological characters from 20 strains were determined, which were selected from the different potato cultivars. The result indicated that out of 20 strains, 13 ones were found to be *Erwinia carotovora* var. *carotovora*, 3 ones to be *Erwinia chrysanthemi*, and others were classified as the intermediate type between *Erwinia carotovora* var. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. Based on their physiological and biochemical characters, the classification was done.

Key words: Potato; Bacterial soft rot; *Erwinia* spp.