

## 葡甘聚糖等碳源对魔芋软腐病病原菌生长的影响

吴金平<sup>1,2</sup>, 罗坤<sup>3</sup>, 宋志红<sup>1</sup>, 刁英<sup>2</sup>, 顾玉成<sup>1</sup>, 胡中立<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>湖北省农业科学院经济作物研究所, 武汉 430064; <sup>2</sup>武汉大学生命科学学院, 武汉 430072;

<sup>3</sup>湖北省农业厅, 武汉 430070)

**摘要:**魔芋软腐病主要由胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜软腐亚种(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E.c.c.*)和菊欧文氏杆菌(*Erwinia chrysanthemi*, *E.ch.*)引起, 此研究通过稀释平板计数法, 明确了葡萄糖、淀粉、甘油、甘露醇、蔗糖、葡甘聚糖、麦芽糖这7种碳源对魔芋软腐病病原菌两个亚种生长的影响。结果表明, 这2个亚种都能很好的利用蔗糖, 且在清水生长情况与在含魔芋粉、淀粉的培养液中生长情况之间没有显著差异, 但在葡萄糖培养液中生长情况还没有清水的好。

**关键词:**碳源; 软腐病原菌; 魔芋

中图分类号: S432.1

文献标志码: A

论文编号: 2009-1934

### Effects of Carbon Source as Glucomannan for the Growth of the Soft Rot Pathogens in *Amorphophallus konjac*

Wu Jinping<sup>1,2</sup>, Luo Kun<sup>3</sup>, Song Zhihong<sup>1</sup>, Diao Ying<sup>2</sup>, Gu Yucheng<sup>1</sup>, Hu Zhongli<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Industrial Crops Institute of Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064;

<sup>2</sup>Wuhan University of College of Life Sciences, Wuhan 430072;

<sup>3</sup>Hubei Provincial Department of Agriculture, Wuhan 430070)

**Abstract:** Soft rot in *Amorphophallus konjac* was mainly caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*E.c.c.*) and *Erwinia chrysanthemi* (*E.ch.*). This study was explicit about the effects of seven kinds of carbon sources (glucose, starch, glycerin, mannitol, sugar, glucomannan and maltose) for the growth of the two subspecies of soft rot bacteria in *Amorphophallus konjac*, through the conventional plate count method. The results showed that the two subspecies of pathogens can be good use of sucrose, and there was no significant difference between growth in water and growth in medium containing konjak glucomannan or starch. But the growth in medium containing glucose was not as good as in water.

**Key words:** carbon source; soft rot pathogens; *Amorphophallus konjac*

### 0 引言

魔芋是天南星科多年生草本植物, 是自然界中唯一含大量葡甘聚糖的特种经济作物, 其在食品、医药保健、工业材料等方面用途广泛<sup>[1-3]</sup>。但随着魔芋种植产业规模的扩大, 魔芋病害发生程度居高不下, 特别是魔芋软腐病, 该病害造成的损失一般在30%~50%, 严重者可达到80%, 甚至绝收。中国大部分魔芋产地均有此

病发生, 国外以日本发病比较严重<sup>[4]</sup>。该病主要是胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜软腐亚种(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E.c.c.*)和菊欧文氏杆菌(*Erwinia chrysanthemi*, *E.ch.*)引起的细菌性病害<sup>[5]</sup>。国内外对该病害的生物学特性<sup>[6-7]</sup>和流行规律<sup>[8]</sup>等进行了长期的研究工作, 也在药物控制、防治等方面取得了许多成绩<sup>[9]</sup>, 但目前尚未从根本上改变软腐病病害严重

**基金项目:**国家科技攻关项目(2007BAD73B00)子课题“魔芋种芋生产过程中的质量监控技术研究与应用”(2007BAD73B01-4)。

**第一作者简介:**吴金平, 女, 1978年出生, 在读博士研究生, 发表相关的学术论文20多篇, 参与编写专著1本。通信地址: 430064 湖北省武汉市 湖北省农业科学院经济作物研究所生物技术研究室, E-mail: wjp9188@yahoo.com.cn。

**通讯作者:**顾玉成, 男, 1957年出生, 研究员, 发表相关的学术论文30多篇, 科普专著1部, 获得湖北省科技进步二等奖、三等奖各1项。通信地址: 430064 湖北省武汉市 湖北省农业科学院经济作物研究所生物技术研究室, Tel: 027-87380926, E-mail: gyach119@yahoo.com.cn。

**收稿日期:**2009-09-22, **修回日期:**2009-10-13。

危害的局面。因此,笔者探讨了魔芋葡甘聚糖等7种碳源对魔芋软腐病病原菌生长的影响,对找到可以控制该菌生长的靶标位点具有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试菌株

2007—2009年,自湖北、湖南、云南、缅甸等地采集表现典型魔芋软腐病状的球茎,采用稀释分离法分离、纯化<sup>[6]</sup>,得到30多个软腐病病原菌菌株,经鉴定为*E.c.c.*和*E.ch.*两亚种。从中选取代表性魔芋软腐病病原菌*E.c.c.* (GenBank 登录号为FJ463863)和*E.ch.* (GenBank 登录号为FJ463871)。

### 1.2 试剂和仪器

葡甘聚糖由湖北省武汉市强森魔芋食品有限公司提供(产品规格:KJ-30)。其余试剂和碳源为化学纯试剂。试验仪器有分析天平、恒温摇床、无菌操作台、移液枪等。

采用的碳源分别为:葡萄糖、淀粉、甘油、甘露醇、蔗糖、葡甘聚糖、麦芽糖及对照(清水)8个处理。碳源浓度为0.4%,所用溶质是蒸馏水,每个三角瓶中分装体积为20 mL。将分装好的溶液在121 °C灭菌20 min备用。

### 1.3 菌体的培养

魔芋软腐病病原菌*E.c.c.*和*E.ch.*在LB液体培养基(胰蛋白胨10 g/L,酵母提取物5 g/L,氯化钠10 g/L, pH 7.0)中28 °C恒温摇床(震荡频率200 r/min)培养12 h,将活化好的菌体用比浊度法稀释控制菌数为 $1 \times 10^7$  cfu/L,分别接0.1 mL稀释好的菌液于配置好的培养液中,在28 °C恒温摇床(震荡频率200 r/min)培养,12 h后以10的倍数梯度稀释,取 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 浓度涂皿(LB固体培养基:胰蛋白胨10 g/L,酵母提取物5 g/L,氯化钠10 g/L,琼脂粉15 g/L, pH 7.0),每组重复3次,30 °C培养20 h后统计数量并进行方差分析。

## 2 结果与分析

采用平皿计数法, $10^{-4}$ 浓度太高,平皿上菌落有的已经连在一起无法计数,而 $10^{-6}$ 浓度的菌落数在甘露醇和葡萄糖上只有几个, $10^{-5}$ 菌落数比较适中。因此,笔者统计 $10^{-5}$ 各碳源菌落数,对此数据进行方差分析,结果表明(表1),菌株之间、碳源之间、以及菌株与碳源的互作均达到极显著水平。2个菌株在含不同碳源的培养液中生长情况达到极显著水平,这与笔者在分离过程中对其致病力检测菌株*E.ch.*的致病力比*E.c.c.*强的结果相吻合。多重比较分析结果表明(表2),菌

表1 方差分析

变异来源	SS	df	MS	F	P-value	F crit
菌株	181179.2	1	181179.2	70.74951	1.30412E-09	4.149097
碳源	1560228	7	222889.8	87.03727	5.22741E-19	2.312741
交互	515335.6	7	73619.38	28.74798	4.44924E-12	2.312741
误差	81947.33	32	2560.854			
总变异	2338690	47				

表2 不同碳源的多重比较

碳源	<i>E.ch.</i>	<i>E.c.c.</i>
	平均数	平均数
蔗糖	826.3aA	314aA
麦芽糖	637bB	280abAB
甘油	523bB	278abAB
魔芋粉	238.7cC	271.7abAB
清水	208.7cCD	251.3bAB
淀粉	140.3cdCD	242bB
甘露醇	54.3dD	25cC
葡萄糖	41dD	24.3cC

注:小写字母表示 $\alpha=0.05$ (差异显著),大写字母表示 $\alpha=0.01$ (差异极显著)。

株*E.ch.*和菌株*E.c.c.*利用碳源的效果是一致的,从好到差依次是蔗糖、麦芽糖、甘油、葡甘聚糖、清水、淀粉、

甘露醇、葡萄糖。在表2中还可以看出,2个菌株在清水中生长情况与在含魔芋粉、淀粉的培养液中生长情况之间没有显著差异。同时,该病菌在含甘露醇和葡萄糖的培养液中生长受到抑制。

## 3 讨论与结论

试验选取的2个菌株*E.ch.*和*E.c.c.*致病力是不同的,笔者进行离体和田间植株致病力鉴定试验获得*E.ch.*致病力比*E.c.c.*强,这与此试验*E.ch.*生长情况比*E.c.c.*好结果相符。针对不同碳源对魔芋软腐病病原菌生长的影响结果表明,病原菌对不同碳源的利用程度不同,其顺序依次是蔗糖、麦芽糖、甘油、葡甘聚糖、清水、淀粉、甘露醇和葡萄糖,利用最好的是双糖(蔗糖),而单糖(葡萄糖)利用最差。这可能与该菌生长的靶标位点有关,有待进一步深入研究。

此试验魔芋软腐病原菌在含淀粉的培养液中生长

情况比在含麦芽糖的培养液中生长情况差,这与黄俊斌等<sup>[6]</sup>在研究魔芋软腐病病原菌对不同碳源的利用,采用在 620 nm 处的吸光度来判断,其淀粉的利用效果比麦芽糖好结果相反。这可能是可溶性淀粉配置成的溶液为悬浊液,对吸光度有一定的影响,而笔者采用平板稀释计数法避免了这一误差的存在。

试验结果对于进一步研究魔芋软腐病原菌的营养生理、致病机制以及该病害的综合治理具有一定的参考价值。软腐病原菌对环境有较强的适应性,即使在清水中都可以生长的非常好,进一步证明了该菌在防治和控制上较难见效的原因。同时,该菌在含葡萄糖的培养液中生长情况没有清水中的好,这为魔芋转基因抗病育种提出了新的思路。

### 参考文献

- [1] 何家庆.论我国魔芋资源产业化与可持续发展[J].武汉植物学研究,2001,19(1):5-9.
- [2] Kimura T,Sugahara T, Fukuya Y, et al.Effects of ultrasonication on refinement of konnyaku power[J]. Journal of Japanese Society of Food Science and Technology, 1997, 44(8):552-559.
- [3] Takahashi H.Manufacture of low-energy instant noodle containing konnyaku[J].Jpn.Kokai Tokkyo Koho JP,1998, 10:113,140.
- [4] Hayashi N.The seed corm transmission of konnykus (*Amorphophallus konjac*) soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*[J]. Gunma J of Agricultural Research, A (General), 1988, 5:25-34.
- [5] 修建华,姬广海,王敏,等.魔芋软腐病菌分子鉴定与遗传多样性[J].微生物学报,2006,46(4):522-525.
- [6] 黄俊斌,邱仁胜,赵纯森,等.魔芋软腐病病原菌的鉴定及生物学特性初步研究[J].华中农业大学学报,1999(5):413-415.
- [7] 唐嘉义,张泽.魔芋软腐病病原菌鉴定及部分生物学特性研究[J].云南农业大学学报,2001,16(3):293-295.
- [8] 邹祥明,谢兰霞.魔芋软腐病流行原因分析及防治对策[J].植物医生,2005,18(5):16-17.
- [9] 鲁红学,周綦,赵明敏,等.不同药剂对魔芋软腐病的防治效果[J].现代农业科技,2007(4):44-45.