

大白菜软腐病的研究

论文集

(一)

方中达 王金生

南京农业大学

植物病理教研组

植物病原生物研究室

一九八五年九月

大白菜软腐病的研究论文集(一)

目 录

1. 大白菜软腐病(*Erwinia carotovora* pv. *carotovora* Dye)潜伏侵染的研究 1~16
2. 大白菜软腐病(*Erwinia carotovora* pv. *carotovora* Dye)潜伏侵染的组织病理学研究 17~32
3. 大白菜软腐细菌(*Erwinia carotovora* pv. *carotovora* Dye)对幼苗根系侵染的研究 33~54
4. 大白菜软腐细菌(*Erwinia carotovora* pv. *carotovora* Dye)从幼根侵染的组织病理学研究 55~80
5. 不同土样中软腐欧氏杆菌的种类和存活 81~94
6. 大白菜软腐病菌(*Erwinia carotovora* pv. *carotovora*)从幼苗叶片的侵入及其在植株内和植株间的转移... 95~108

7. 几个抗性细菌对大白菜生长和软腐病发生的影响。

..... 109~116

大白菜软腐病

(*Erwinia carotovora* pv.
carotovora Dye)

潜伏侵染的研究

王金生 董汉松 方中达

南京农业大学

(中国科学院基金资助课题)

提 要

大白菜贮藏期软腐(*Erwinia carotovora* pv. *carotovora* Dye)是城市冷库贮藏中严重的病害问题。据在南京蔬菜公司冷库调查,常年因软腐病引起的损失达总入库量40%~70%。三年来,对不同来源和品种的外表完全健康的大白菜进行厌气诱发检测,结果在近500株被测的大白菜植株中,潜伏带菌率达99.6%,对10株大白菜的所有叶片逐张进行检查的结果表明,内、外叶片都有潜伏的细菌存在。叶平均带菌率47.7%,最高82.8%,最低为4.5%。将叶片用75%的酒精表面消毒1.5—2分钟后通常并不明显减轻叶片的腐烂。自然潜伏带菌的叶片,诱发发病后叶斑多与叶脉作平行分布。对生长在两个试验区的共十七个品种的大白菜分别进行潜伏带菌程度的比较,不同品种的白菜在两块田中的潜伏带菌趋势基本上是一致的。按诱发发病后的叶发病率和病情指数将这十七个品种分为三个组。

大白菜软腐病 (*Erwinia carotovora* pv. *carotovora*) 是大白菜贮藏期最重要的病害。据在南京蔬菜公司冷库调查, 每年因软腐病造成的损失达大白菜入库量的 40%。关于引起贮藏期大白菜病烂的病原细菌的来源还不是很明确的。多数研究认为贮藏发病是植株表面带菌然后由伤口侵染, 或由于昆虫传播的细菌侵染而引起的 (1·2)。也有人认为, 贮藏期大白菜由于抗性降低, 叶片表面的病原细菌有可能直接侵染寄生组织 (5)。但上述论点, 尤其是后一种认为, 都缺乏实验证据, 同时也很难解释贮藏期大白菜软腐发生如此严重的现象。近年来, 国内外的研究表明, 其他作物上的软腐病如马铃薯块的软腐, 皮孔潜伏带菌现象非常严重, 是造成贮藏期腐烂的主要原因 (14, 15, 18)。

本研究主要目的是弄清大白菜软腐病菌是否具有潜伏侵染现象, 潜伏侵染导致贮藏期腐烂的可能性, 潜伏侵染的普遍性, 潜伏侵染的部位以及不同品种之间潜伏侵染的差异。

材 料 和 方 法

供检测的大白菜植株部分来自市场和南京蔬菜公司冷库。这些大白菜的品种不明。不同品种的大白菜植株分别由江苏省农科院蔬菜研究所和本校园艺系提供。

用厌气技术检查大白菜组织的潜伏带菌 (4, 16)。将大白菜叶片自外而内逐张剥离, 用 75% 酒精消毒或不消毒, 消毒者在酒精中浸 1~3 分钟, 灭菌水洗, 分别装入市售的适当大小的新塑料食品袋中, 再放在真空干燥器中, 反复三次抽氧和冲气。而后放 27—29 摄氏度下培养, 4 天后检查发病情况。叶片 (叶柄) 腐烂按下列标准进行

分级记载：

病 级	发病程度	代表数值
0	不发病	0
1	病斑始见，水渍状，直径小于一个厘米	1
2	只有一个软腐斑，直径大于1厘米。	2
3	有两个以上软腐斑直径大于2厘米，但不连成片片	3
4	软腐斑连片，叶片大部或全部弥烂	4

从厌气处理后的大白菜叶柄上出现的侵离斑分离原细菌并按 Kelman 等的方法区别软腐细菌的种和变种。所用的试验有马铃薯块的腐烂试验，在 C V F 培养基上生长和产生凹陷的试验，温度 36°C 下生长试验，从蔗糖产生还原物质的试验， α -D 甲基葡萄糖苷试验和磷酸脂酶试验等〔4、6〕。

为了明确诱发处理后引起发病的细菌在大白菜组织中的潜伏部位，除观察表面消毒对叶片的影响外，还直接在叶片的不同部位点滴细菌悬浮液进行接种，再在厌气和通气条件下诱发其发病以决定表面的细菌是否可以直接侵染。

供试菌株 (*Erwinia carotpvora* pv. *carotovora*)

在改良的肉汁琼脂培养基(酵母浸膏的含量为1%), 28℃下生长48小时。细菌悬浮液是用灭菌的磷酸缓冲液(0.15M, pH 7.2)配成, 浓度为 1.96×10^8 CFU/毫升(CFU为菌落形成单位)。或在磷酸缓冲液中加入0.09%果胶酸钠, 加入细菌后再继续在28℃下慢速振荡18小时, 接种时菌液浓度为 5.52×10^{10} CFU/毫升。接种时先将叶片的叶柄及绿色叶片部分切成3~5×5厘米大小的方块, 用75%酒精消毒1分半钟后, 在无菌蒸馏水中洗净, 凉干。组织块放在灭菌的培养皿中, 下面放一张灭菌的湿润滤纸。为了防止接种时菌液污染组织块切口, 接种前先用灭菌凡士林在组织块的中央划出一个平方厘米大小的框界, 再用移液器(吸头已灭菌)在框界内滴20微升的菌液。

试验结果

三年来, 对来自蔬菜市场, 南京市蔬菜公司冷库, 江苏农科院蔬菜所马群试验点及本院蔬菜试验田不同品种大白菜共500株进行厌气诱发的结果, 仅有二株叶片全不发生腐烂, 植株的潜伏带菌率为99.6%。经鉴定引起腐烂的病源细菌是胡萝卜软腐欧氏杆菌胡萝卜变种(*Erwinia carotovora* pv. *carotovora*)。

先后对10株大白菜所有叶片剥离后消毒, 装袋, 厌气诱发, 单株叶片带菌率在5~82.8%, 多数在20%以上(表1)。表2记载了两株大白菜

表1 大白菜叶片剥离后分别厌气诱发的发病

株 号	总叶片数	病叶数	病叶率 %
1	30	16	53.3
2	28	23	82.1
3	28	6	21.4
4	30	4	13.3
5	28	20	71.4
6	26	12	46.2
7	20	12	60.0
8	22	18	82.8
9	26	11	42.3
10	22	1	4.5

从外到内所有叶片，厌气诱发后按级记载的发病情况。从两株大白菜各张叶片的发病情况看，植株内病原细菌的潜伏侵染是全株性的。

表2 厌气诱发后每张大白菜叶片（从外到内）的发病情况

株号	从外到内各张叶片的发病等级																												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1	3	3	0	+	*	2	0	2	0	0	4	4	3	2	4	2	0	2	4	4	0	0	0	4	0	2	2	0	4
2	3	0	3	0	0	2	4	4	4	4	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	2	2	0	6	2	2	2	

* “+”表示发病，但发病等级漏记。

同时发现，浸离斑的发生是沿叶脉作平行分布的。诱发后浸离斑的发展过程是，一天后，从叶柄外侧（植物学上的下表皮）可见针尖大小的水渍状斑点，浸离斑始自组织内的维管束部位，以后病斑逐渐扩大，病斑数目也有所增加。当一张叶片上有数个病斑发生时，它们通常在出现的早期排列成条点状。病斑愈合后，叶柄组织则沿叶脉形成长条状腐烂斑（图1）。

为了研究在植株体内、外的病原细菌引起叶片腐烂的可能性，比较了表面消毒和不消毒，叶片上出现的病斑数以及病斑在内外表皮上的发生情况。表3是10个大白菜品种，厌气诱发前消毒或不消毒，每处理3株，每株4张叶片，共计12张叶片厌气诱发后的发病情况。表中的数字系所有处理叶片上出现的病斑的平均值。结果表明，所有处理叶柄外表皮上出现的病斑数都远远超过内表皮上出现的病斑数。诱发前叶柄用75%酒精表面消毒并不能完全消除在叶片内、外表皮上的病斑。叶柄上病斑减少的程度依品种的不同而异，其中有些品种消毒和不消毒处理的叶柄表面病斑数目基本没有差别，如青杂三号，青杂五号，青石，厉城小梗×福山包头，青杂中丰和青麻叶等。

为了明确叶片表面附生的病原细菌引起侵染的可能性，分别在叶片与叶柄表面接种菌龄为48小时的细菌悬浮液，结果在用磷酸缓冲液稀释的菌液接种时，只有一块组织块从接种区开始腐烂，用含果胶酸钠的磷酸缓冲液制成的菌悬液接种时也只有二片叶柄从接种点开始腐烂（表4，表5）。

表3 诱发前大白菜叶柄消毒和不消毒处理诱发后的
病斑发生数目和部位

品 种	不同处理叶柄内外表皮发生的病斑数			
	外 表 皮		内 表 皮	
	消 毒	不消毒	消 毒	不消毒
青杂三号	19	19	3	2
青 丰	1.3	5	0	1.7
青 石	8.5	7.8	0.5	5
青杂5号	14	19	4.5	5.0
厉×福*	10.5	8	0	0.5
青杂中丰	18	3.7	2.5	6.7
玉田色尖	3	56	4	5
青麻叶	44	31.6	3.7	29
青×福*	5	21	0	1.6
81-5	1	30	0.75	0.3

* 厉×福：厉城小梗×福山包头

青×福：青麻叶×福山包头

测定不同品种大白菜潜伏带菌的差异是用灰气诱发的方法分别测定了来自南京市郊马群公社青马大队江苏农科院试验田中的9个品种和南农校园内园艺系试验田中的13个品种的潜伏带菌率和根据叶柄上病斑的分布和扩展情况计算的病情指数(表6, 表7)。测定时每个来源的品种各取3株, 每株均从第10—20张叶片(从外向里)中取出8片, 其中4片作表面消毒处理, 另4片不作消毒。结果是所

表4 用磷酸缓冲液配成的菌液接种叶柄和绿色叶片
在不同条件下诱发发病的情况(27~29℃)

处理与部位		条件	接种组织 块 数	接种点腐 烂 数	第六天从非 接种点腐烂数
接 种	绿色叶片	厌气	10	0	7
	叶 柄	厌气	10	1	5
	叶 柄	通气	10	0	10
不 接 种	叶 柄	厌气	10	0	1
	叶 柄	通气	10	0	10

表5 用含果胶酸钠的磷酸缓冲液稀释的菌液
接种叶柄在不同条件下诱发发病的情况

诱发条件	接种组织 块 数	接种点腐烂数	第五天非接种 点腐烂数
厌气, 28℃	15	0	0
通气, 28℃	5	2	0

有供试品种都有潜伏带菌现象,但从不同试验区中采集的不同品种的潜伏带菌的程度有明显差异。按发病轻重马群试验区大白菜的潜伏带菌程度是:81-5<小石ABX五号白菜<青杂3号<厉城小梗>福山包头<青杂中丰<早青<青石<青杂5号<青丰。南农试验区不同品种大白菜的潜伏带菌程度是:城阳青<青杂5号<福山包头<81-5<晚青一号>冠县包头<青杂3号<小青口<青麻叶>福

表6 马群试验区不同大白菜品种诱发后的病叶率和病情指数

	处理 方法	青丰	杂青 5号	青石	早青	杂青 中丰	厉城小梗 ×福山包头	青杂 3号	小石A.B.X 5号白菜	81-5
病叶率%	消毒	100	100	100	100	61.1	66.7	58.0	8.6	41.7
	不消毒	100	100	100	50	66.7	75.0	66.7	33.3	25.0
病情指数	消毒	66.7	53.1	28.1	50	21.5	33.3	18.3	2.1	12.5
	不消毒	96.7	59.3	43.8	27.5	18.3	43.7	22.9	8.0	12.5

表7 南农试验区不同大白菜品种诱发后的病叶率与病情指数

	处理 方法	连 半	青 丰	青 麻叶	青杂 中丰	青杂 3号	玉田 包头	青×福	小青口	晚* X冠	81- 5	福山包	青杂 5号	城阳青
病叶率%	消毒	100	50.0	58.3	62.5	75.0	58.3	55.6	50.0	50.0	44.4	25.0	16.7	25.00
	不消毒	100	83.3	75.0	100	75.0	83.3	63.9	58.3	41.7	33.3	41.7	33.3	0
病情指数	消毒	100	56.3	43.75	37.5	33.3	29.2	25.0	22.9	19.4	21.5	14.6	10.4	6.25
	不消毒	100	70.8	52.1	62.5	56.3	40.3	37.5	43.7	25.6	12.5	18.8	12.5	0

* 青×福：青麻叶×福山包头 晚×冠：晚青1号×冠县包头

包头<玉田包尖<青杂3号<青杂中丰<青麻叶<连丰。依发病率和病指数，可将这十七个品种分为三个组：抗病组（81-5，福山包头，城阳青，晚青1号×冠县包头），感病组（青丰，青石，连丰，青麻叶，小青口）和中抗组（其余）。

讨 论

植物特别是蔬菜植物中细菌的潜伏侵染现象是非常普遍的，其中包括腐生细菌和一些植物病原细菌〔7〕。马铃薯软腐病菌潜伏侵染的研究表明，薯块皮孔内和薯块表面的软腐欧氏杆菌对于该病原细菌的传播和贮藏薯块腐烂都具有非常重要的作用〔4, 15〕。对于潜伏侵染的细菌在正常条件下不引起腐烂的原因，目前还很难作出明确的解释，一般理解为这是病原细菌与寄主植物间达成的一种平衡〔11〕。裘维藩等早在六十年代之前就对大白菜在田间和贮藏期发病的原因进行了广泛的研究，并认为昆虫传播在大田和贮藏发病中起重要作用〔1〕。近年来，美国、日本和国内用选择性培养基直接和富集分离的方法证明胡萝卜欧氏杆菌胡萝卜致病变种（*Erwinia carotovora* pv. *carotovora*）可以在土壤中越冬〔3, 9, 17〕，同时也证明了田间大白菜茎组织中软腐细菌的潜伏侵染现象，并认为这是高温和高条件下引起发病的原因〔10〕。本研究用厌气诱发的方法进一步证明了大白菜软腐细菌潜伏侵染的普遍性和全株性。由于诱发时的厌气条件与冷库贮藏条件接近，所以认为冷库中大白菜严重腐烂现象是病原细菌和寄主之间的平衡受到破坏，潜伏细菌大量繁殖的结果。诱发

后，叶柄上出现的浸离斑排列成条点状，而且表面消毒后叶柄上出现的病斑数不见减少，说明潜伏的细菌主要在组织内部，可能主要潜伏在维管束中。关于病菌在维管束中潜伏的假设，还可以从病斑首先在叶柄外侧出现的现象得到进一步证明。我们测量了三个品种（青杂 8 号，厉城小梗×福山包头，8-1-5）叶柄横切面维管束到内、外叶表面的距离，结果发现维管束到内表面的距离都大于到外表面的距离，两者比值平均为 1.37（变化幅度为 1.12—1.56）⁽³⁾。这样，潜伏在维管束中的病原细菌从维管束内突破后蔓延到叶内组织，就会首先在外表面看到浸离斑。关于病原细菌侵染维管束的现象在其他细菌性病害包括由其他软腐欧氏杆菌引起的病害中已有报导^[12]。在叶表点滴细菌悬浮液接种后一般不引起组织软腐。少数叶柄组织从接种点开始发病的现象可能与接种区内存在伤口有关。这说明，植物在无伤条件下表面带菌可能不是发病的主要原因。Kikumoto 等从不同大白菜品种表面病原细菌的动态与植株发生腐烂的动态不表现明显相关的现象也提出植株表面的病原细菌可能与病害发生不存在直接关系^[8, 9, 13]。

关于大白菜软腐菌潜伏侵染的研究给进一步研究病害侵染循环规律和制订防治策略提供了新的启示。不同品种之间潜伏侵染的差异为评价品种抗病性提供了新的标准和方法以及为研究病原细菌与寄主之间的关系提供了新的途径。但是，关于病菌潜伏的组织病理学以及不同品种潜伏侵染程度与田间抗病性和伤口侵入后抗扩展的能力之间的关系还有待进一步研究。

图 1 诱发后大白菜叶柄上出现沿叶脉平行排列的浸离斑

参考文献

1. 裘维藩, 阮继生, 王祈楷 1955, 中国大白菜上几种害虫的防治对于减轻田间软腐病发生的效果。植物病理学报 1(1) 71-78
2. 方中达, 陆家云 1979, 普通植物病理学 农业出版社。
3. 董汉松 1985, 硕士研究生毕业论文
南京农业大学。
4. 王金生, 韦忠民, 方中达 1985, 马铃薯软腐细菌的鉴定。
植物病理学报 15(1) 25-30。

- 5) Agrious, George N. 1978, Plant Pathology, 2nd ed. Academic, New York, NY. 703pp. Barne, E. H. 1979
- 6) De Boer, S. H. and A. Kelman 1975, Evaluation of procedures for detection of pectolytic *Eriwnia* spp. on potato tubers. Am. Potato J. 52:117-123.
- 7) Hayward, A. C. 1974, Latent infection by bacteria. Ann. Review of Plant Pathology. 12:87-79.
- 8) Kikomoto, T. and T. Omatsuzama, 1976, Ecological studies on the soft rot bacteria of vegetables XIV. Effect of plant age on the multiplication of the soft rot bacteria and its relation to the soft rot disease development among chinese cabbage cultivar in the field. Bull. Inst. Agri. Res. Tohoku Univ., 27:93-112. 1976.
- 9) Kikomoto, T. 1980, Ecological aspects of the soft rot bacteria. Rep. Inst. Agri. Res. Tohoku Univ., 31:19-41.
- 10) Kikomoto, T. and T. Omatsuzawa 1981, Ecological studies on soft rot bacteria of vegetables (15) Latent infection of chinese cabbage by the soft rot bacteria in the field. The report

of the institute of agricultural research VOL
32:27—35.

- (11) Mew, T. W., W. C. Ho, and L. Chu. 1976, Infectivity and survival of soft rot bacteria in chinese cabbage. *Phytopathol.* 66:1325—1327.
- (12) Nelson, P. E. 1970, Histopathology of plants infected with vascular bacteria pathogens. *Ann. Review of Plant Pathology* 8:259—280.
- (13) Omatsuzama, T. and T. Kikumoto 1976., Development of soft-rot disease and lesion formation on the petiole of chinese cabbage at its the growth stage. *Bull. Inst agri. Res. Tohoku Univ.*, 27:113—124.
- (14) Perombelon, M. C. M. 1972. The effect and survival of contamination of potato stocks in Scotland by *Erwinia carotovora* var. *carotovora* and *E. carotovora* var. *atroseptica*. *Ann. Appl. Biol.* 71:111—117.
- (15) Perombelon, M. C. M. 1973. Sites of contamination and number of *Erwinia carotovora* *carotovora* present in stored seed potato stocks in Scotland. *Ann. Appl. Biol.* 74:59—65.
- (16) Perombelon, M. C. M. 1975, A reliable and rapid method for detecting contamination of potato tubers by *Erwinia carotovora*. *Plant Dis. Rept.*