

马铃薯软腐病研究 论文集

南京农业大学植物病理教研组

一九八六年九月

目 录

- 1、马铃薯软腐病细菌的鉴定(本文发表在植物病理学报第15卷第1期)
- 2、马铃薯块茎对软腐病的抗病性评价方法及我国部分地区主要马铃薯品种的抗病性鉴定(本文已发表在中国农业科学1986年第4期)
- 3、引起马铃薯软腐的菊欧氏杆菌(Erwinia chrysanthemi Burkholder)的生物型和血清型(待发表)
- 4、胡萝卜软腐欧氏杆菌(Erwinia carotovora pv carotovora Dye)菌落突变型生物学性状的研究(待发表)
- 5、软腐欧氏杆菌对马铃薯块茎的致病性及马铃薯块茎感病性的比较研究(待发表)
- 6、软腐欧氏杆菌在不同温度下产生胞外酶的比较研究。
- 7、马铃薯块茎对细菌软腐病抗性生理指标的研究 I、游离氨基酸含量及其与软腐病抗性的关系。
- 8、马铃薯块茎对细菌软腐病抗性生理指标的研究 II、还原糖含量及其与软腐病抗性的关系。
- 9、马铃薯块茎对细菌软腐病抗性生理指标的研究 III、酚类物质的含量及其与软腐病抗性的关系。
- 10、我国马铃薯品种(系)抗软腐病种质鉴定。

马铃薯软腐病细菌的鉴定

王金生 韦忠民* 方中达

(南京农学院)

(1983年 9月16日收稿)

提 要

比较了4种方法(结晶紫果胶酸钠培养基直接分离、富集分离技术、雾室技术和厌气技术)检查薯块带菌率的结果。平均10个薯块的带菌薯块数分别为1、7.3、8.7、10。用厌气技术对来自全国23个省、市和地区的46份样本中460块薯块进行带菌检查的结果。各样本之间的带菌率高低是不同的,在40—100%之间,平均为39.3%,即共有181块薯块由于软腐欧氏杆菌的危害而发生腐烂。

从33份腐烂马铃薯样本中,共分离到284个软腐欧氏杆菌的菌株。鉴定结果:其中206个菌株(占72.5%)是 Erwinia carotovora var. carotovora, 发现于各省(区)所有马铃薯样本中;有15个菌株(占5.3%)鉴定为 Erwinia carotovora var. atroseptica, 主要发现于北方省区(如黑龙江、青海、河北、甘肃以及四川等省); 29个菌株(占10.2%)鉴定为 Erwinia chrysanthemi, 发现于来自四川、江苏、江西和内蒙的样本中。另有34个菌株, 根据其细菌学性状分别归入两个不同类型的中间型, 介于E、

carotovora var. carotovora 和 E. chrysanthemi 之间。

马铃薯细菌性软腐病 (Erwinia spp.) 是国内外发生很普遍的重要病害。马铃薯薯块带菌不仅关系到贮藏和运输期间薯块的腐烂, 还在大田生长期引起缺苗和中, 后期发生黑胫 [20, 36]。据有些报道, 贮藏期薯块软腐的发病率一般在 3—5%, 生长期的黑胫发病率可达 2% [41, 27]。引起马铃薯软腐的欧氏杆菌有胡萝卜软腐欧氏杆菌黑胫变种 (Erwinia carotovora var. atroseptica (Van Hall) Dye), 胡萝卜软腐欧氏杆菌胡萝卜变种 (Erwinia carotovora var. carotovora Dye) 和菊欧氏杆菌 (Erwinia chrysanthemi Burkholder et al) [27]。有关上述 3 种细菌在我国分布及其与马铃薯软腐病的关系还不很清楚。

本文报道用几种方法检查国内部分马铃薯产区薯块带菌的程度以及引起软腐的欧氏杆菌的种类和地理分布。

材料和方法

从全国 23 个省、市、自治区收集到的 46 份马铃薯薯块样本为供试材料。试验先以一个马铃薯薯块的样本, 用 4 种方法检查薯品种的

* 植物病理教研组研究生。

块带菌情况：①直接分离法，即用削皮水果刀逐个削削马铃薯块的表皮，在2倍量（即每10克表皮加培养液20毫升）的经过修改的Meneley富集培养液〔12〕中捣碎后，分别装在150毫升灭菌三角瓶中，30分钟后吸0.1毫升浸出液于结晶紫果胶酸钠（CVP）琼胶培养基平板〔1, 9〕上，涂布分离软腐欧氏杆菌（*Erwinia* spp.），②富集技术，即将上述处理液先在25℃下培养48小时，适当稀释后吸取0.1毫升浸出液于CVP培养基琼胶平板上涂布分离软腐欧氏杆菌；③雾室技术，即将待检薯块平摊在密闭雾室的铁架上，用自来水连续喷雾，使薯块表面保持水膜，3天后逐个检查薯块软腐的发生情况，并分离细菌进行鉴定；④厌气技术，即用灭菌卫生纸将薯块逐个包裹后，再用灭菌水沾湿，放在真空干燥器中反复3次抽气和充氮气，最后密封干燥器，在22℃下保持3—4天后检查其腐烂率，并分离软腐细菌进行鉴定〔11〕。

软腐欧氏杆菌的分离根据软腐欧氏杆菌能在CVP琼胶平板上产生很深凹陷的特征，从凹陷中心挑取典型菌落在肉汁胨培养基上划线纯化，再在立体解剖镜下根据软腐欧氏杆菌的典型交叉网格状菌落，挑取单菌落纯化作为纯培养保存和鉴定。为了确定分离到的细菌是软腐欧氏杆菌，主要依据革兰氏染色反应（Hucker法）、鞭毛（sares—Gill法），在CVP培养基上的溶果胶能力，在金氏B培养基上不产生荧光色素以及碳水化合物代谢发酵型〔1, 12, 13, 21〕。根据Graham和Perombelon等人的工作并参照其方法，选择下列试验鉴定软腐欧氏杆菌的种和变种，即细菌在35℃和39.5℃下的生长能力，在5% NaCl中的生长情况，磷酸脂酶反应，吲哚产生，葡萄糖产气，乳糖、麦芽糖、海藻

糖产酸〔17·27〕以及从蔗糖产生还原物质的能力〔15〕。
 细菌的致病性测定是按A. Kelman 描述的方法在马铃薯片上进
 行的〔10〕。

表1. 各地马铃薯块经厌气处理后发
 生软腐的情况*

薯 块 来 源	检查10个薯块发 生软腐薯块数
河北省	0
康保县	5
丰宁县	7
遵化县	7
围场县	2
山西省	2
内蒙古自治区	10
四子王旗	3
察哈尔左翼后旗	5
乌盟丰镇县	8
黑龙江省	8
哈尔滨市郊	8
集贤县	10
吉林省	9
农安县	0
辽宁省	9
本溪马铃薯研究所	0
山东省	0
县	2
江苏省	2
射阳县	3
扬州市郊	3

续

薯块来源		检查 10 个薯块发生软 腐薯块数
	江阴县	4
浙江省	嘉兴县	3
江西省	庐山马铃薯研究所	1
	景德镇市	3
河南省	商丘市	5
湖北省	巴东县	0
	长阳县	3
	江陵县	3
广东省	海通什县	5
广西壮族自治区	三江(1)	3
	三江(2)	5
陕西省	西安市效	2
	高石	2
青海省	互助县(1)下容65号	3
	(2)高原8号	0
	(3)互助50号	2
新疆维吾尔自治区		
	石河子农学院	0
四川省	重庆市郊	3
	梓潼	0
	射洪县	0

续

薯块来源	检查10个薯块发生软腐薯块数	
彭县	6	
仁寿县	4	
绵竹县	3	
灌县	10	
阿坝自治州	8	
凉山自治州	4	
贵州省	呼兰	7
北京市	延庆县	2
甘肃省	武威县	1
	临洮县	0
	马铃薯研究中心	0

●作者诚挚感谢各省、县和有关单位协助征集马铃薯块样本

试验结果

用4种不同方法对同一马铃薯样本带菌率检查效果的试验，是王金生在美国威斯康辛大学进行的。研究用薯块取自该州北部的一种薯繁殖场。每种方法检查30个薯块。试验结果证明，以厌气技术检查方法的效果最高，各种方法的检出率如下：厌气技术处理的

的结果30个薯块全部腐烂，雾室技术为26块，富集技术为22块，直接分离法只从3个薯块上分离到细菌。平均10个薯块的带菌块数分别为10、8.7、7.3和1。

由于灰气技术检查薯块带菌率的效果最好，所以在大量样本检查时采用了这种技术。对来自全国23个省、市的46份样本共460个薯块的分析结果，其中181块发生软腐并证明是由软腐欧氏杆菌引起的薯块带菌率达39.3%。不同地区收集到的样本检查到的带菌率差别很大，薯块的带菌率从0—100%。甘肃、新疆、青海等地的样本检出的带菌率较低，其中有些没有检查到软腐细菌；吉林、黑龙江、内蒙古等地的薯块检出的带菌率较高，有些样本的带菌率高达100%（见表1）

种和变种的鉴定：从33个腐烂马铃薯样本分离284个软腐欧氏杆菌菌株，通过鞭毛染色和14个重要生理生化试验鉴定细菌的种和变种，结果是其中206个菌株是 Erwinia carotovora var. carotovora，占总菌株数的72.5%；15个菌株为 E. carotovora var. atroseptica，占总菌株数的5.3%；29个菌株鉴定为 E. chrysanthemi，占总菌株数的10.2%。另外，还有2个不同类型的中间型I的5个菌株其特征除吲哚试验阴性外，其余特征均与典型的 E. chrysanthemi 相同。属于中间型II的29个菌株是除吲哚反应阳性外，其余特征都与 E. carotovora var. carotovora 相同，在这一组中30%的菌株可以从蔗糖产生还原性物质（见表2）

危害马铃薯的 3 个主要软腐欧氏杆菌种和变种的发现地区是不同的。
E. carotovora var. *carotovora* 是全国性的，在被检查的 23 个省、市、区的马铃薯样本中，凡有软腐发生，都分离到了这个变种；*E. carotovora* var. *atroseptica* 主要在我国北方发现（如黑龙江、青海、甘肃和河北部分马铃薯产区），但是在四川冷凉山区也有发生；*E. chrysanthemi* 引起的马铃薯腐烂主要在我国偏南方地区发生，但部分偏北地区也有发生（见表 3）

表 3 不同地区的样本中软腐欧氏杆菌的种和变种的分布情况

种或变种	分 布
胡萝卜软腐欧氏杆菌胡萝卜变种	送测样本的所有省区
胡萝卜软腐欧氏杆菌黑胫变种	黑龙江、河北、四川、青海、甘肃
菊欧氏杆菌	四川、江苏、河北、江西、内蒙古
中间型 I	四川、江苏、内蒙古
中间型 II	海南岛、江西、四川、青海

讨 论

结晶紫果胶酸钠(CVP)培养基是比较好的从土壤和其他材料中分离软腐欧氏杆菌(*Erwinia* spp.)的选择性培养基(9)。因为分离前,分离材料一般须加一定量的稀释或浸泡液,所以带菌量过低,直接分离就不易成功(12)。富集技术解决了低菌量的问题,但有时会因材料中拮抗细菌的存在而影响软腐欧氏杆菌种群的增长。雾室和厌气技术是近年来在马铃薯细菌性软腐病的研究中使用的新技术(11, 23, 26)。雾室技术可以测定大批量的薯块样本,但比较起来厌气技术检查薯块带菌更精确。厌气条件对马铃薯细菌性软腐病的诱发作用涉及多方面的因素,缺氧有利于细菌胞外酶对植物组织的浸离作用(maceration),还抑制了许多与寄主植物抗性有关的代谢过程,如细胞组织的木栓化、酚向醌的转化以及植物抗毒素——日齐素(Rishitin)的形成(24)。另外,软腐欧氏杆菌可在厌氧条件下生长,而好气的拮抗细菌却可能被抑制。水膜不仅造成薯块组织厌气,还利于细菌的运动和侵入以及增加植物表面和细胞间隙中营养物质的渗漏等(20)

检验马铃薯带菌率的方法和各地薯块带菌情况的研究,对我国马铃薯软腐病发生程度的估计以及无病种薯繁殖基地的建立提供依据。应该指出,本研究由于样本数量和测定薯块数量的限制,所得的结果是否^有代表性还值得进一步研究。同时带菌薯块是否发生腐烂,还取决于贮藏运输中的环境条件。

在上述3种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。有些国家以*E. carotovora* var.

atroseptica 为主〔11, 25〕, 有些国家则主要是 E. carotovora var. carotovora 为主〔22〕, 只有少数报道, 在自然情况下发现 E. chrysanthemi 危害马铃薯〔13, 23, 29〕, E. chrysanthemi 被认为主要危害热带、亚热带植物和温室中的观赏植物以及少数几种大田作物, 如玉米、水稻和菠萝〔27〕。

国内关于细菌性软腐病的研究, 最早见于黄亮教授对南京地区大白菜和其他作物上软腐病的研究以及裘维蕃教授对北京地区大白菜软腐病的研究〔4, 5, 19〕, 认为我国的软腐欧氏杆菌是海芋欧氏杆菌 (Erwinia aroideae)。这种细菌 E. carotovora var. carotovora 的主要区别是前者利用碳水化合物时不产气, 后者产气。Dye (1969) 对这些细菌的多种性状进行了比较研究, 认为 E. aroideae 和 E. carotovora var. carotovora 是很难区分的, 从碳水化合物产气这一性状是不稳定的。他研究了50株 E. carotovora var. carotovora 和10株 E. carotovora var. atroseptica 从葡萄糖产气的性状, 结果都是半数左右为阳性〔18〕。本试验结果表明, 我国马铃薯上的 E. carotovora var. carotovora 菌株大多数是不产气的, 而 E. carotovora var. atroseptica 则大多数是产气的。国内过去对 E. carotovora var. atroseptica 的记载, 主要根据马铃薯植株的黑胫症状〔2·6〕, 但是根据报道不同的软腐欧氏杆菌在适宜条件下都能引起黑胫〔27〕。因此本研究首次证实 E. carotovora var. atroseptica 和 E. chrysant-

hemi 在国内的发生和分布 (2·3)。

另外, 根据吲哚试验反应的变化, 本试验描述的两个中间型是介于 E. carotovora var. carotovora 和 E. chrysanthemi 之间的。这与 L. Ciampi-panno 报道的智利的马铃薯软腐欧氏杆菌菌株, 由于 α -甲基葡萄糖苷和从蔗糖产生还原物质这两个试验的变化而存在着 E. carotovora var. carotovora 和 E. carotovora var. atroseptica 两个变种之间的中间型不同 (8)。另外, 根据 D. C. G. Graham 对 623 个 E. chrysantham 菌株的研究结果, 100% 的菌株表现吲哚试验阳性, 39 个 E. carotovora var. atroseptica 从 α -甲基葡萄糖苷产酸的菌株为 94%, 从蔗糖产生还原物质的菌株为 98% (22)。进一步研究这些中间型与 3 个命名种之间的关系在分类上有一定意义。此外, 菊欧氏杆菌已发现有 6 个致病变种。据 Cother (1983) 报道澳大利亚马铃薯上的菊欧氏杆菌是玉米致病变种 (E. chrysanthemi pv. zeae (Sabet) Victoria et al) (8)。初步研究表明, 国内从马铃薯块上分离到的这些菊欧氏杆菌并不侵染玉米和水稻, 因此, 它们与其他致病变种的关系有待从各寄主上分离更多的菌株进行比较研究。

参 考 文 献

- (1) 方中达: 1979 植病研究方法, 403页, 农业出版社。
- (2) 方中达, 任欣正: 1981, 我国植物细菌病害名录补志
南京农学院学报, 1981, No. 3 1-4。
- (3) 俞大绂, 方中达: 1956, 中国植物病原细菌的初步名录
农业学报, 7(3): 357-363。
- (4) 裘维蕃, 张纪增, 陶国华: 1955, 中国大白菜品种对于
软腐细菌(Erwinia aroidae) 抗病力的差异, 植物病理学报,
1: 61-70。
- (5) 裘维蕃, 狄原激, 周毓琰, 司凤举: 1964, 大白菜窖藏
中一些腐烂细菌的研究 植物病理学报7: (2) 127-134。
- (6) 甘肃省农业科学院会川实验组: 1983, 洋芋黑胫病及其防治
甘肃农业科技5: 11-13。
- (7) Ciampi-panno, L. 1981, Taxonomy and etiology of
soft rot Erwinia affecting potatoes in Southern
Chile. International Conference on Plant Pathogenic
bacteria, 5th., Cal., Colombia, 1981, Proceedings, 3
Edited by Lozano, L.C. Cali, Colombia, Centro internacional
de Agricultura Tropical. p.640.
- (8) Cother, E.J. and V. Powell 1983 Physiological and pa
thological charecteristics of Erwinia Chrysanthemi
isolates from potato tubers, Journal of Applied
Bacteriology 54:37-43
- (9) Cuppels, D., and A. Kelman, 1974, Evaluation of selecti

media for isolation of soft rot bacteria from soil and plant tissue, *Phytopathol.* 64:468-475.

(10) Cuppels, D., and A. Kelman, 1980, Isolation of pectolytic fluorescent Psuedomonas from sets and potatoes, *phytopathol.* 70:1110-1115.

(11) De Boer, S.H., and A. kelman, 1975, Evaluation of procedures for detection of pectolytic Erwinia spp. on potato tubers, *Am. Potato J.* 52:117-123.

(12) De boer, S. H., E.Allan and A. Kelman 1979, Survival of Erwinia carotovora in Wisconsin soil. *Am. Potato J.* 56:243-252.

(13) De lindo, L., Frerch, F.R and A.Kelman, 1978, Erwinia spp. pathogenic to potatoes in peru, *Am.Potato J.* 55:383.

(14) Dye, D.W, 1969. A taxonomic study of the genus Erwinia 11. the "carotovora" group. *N.Z. J. Sci.* 12: 81-97.

(15) Dye, D. W., and Kemp, W. J. 1977, A taxonomic study of plant pathogenic Corynebacterium species, *N.Z. Jourenal of Agricultural Research*, 20:563-582.

(16) Ficke, W., Naumann, K., Skadaw, K., Muller, H., J., and Zieke, R. 1973. Die Lebensdauer von pectobacterium carotovorum var. atrosepticum (Van Hall) Dowson an pflanzgut und im Boden, *Arch. Phytopathol pflanzenschut*