

西葫芦软腐病病原的初步研究

李 林¹, 徐作珽¹, 李长松^{1*}, 齐军山¹, 李 凡¹, 郑继法²

(¹ 山东省农业科学院植物保护研究所, 济南 250100; ² 山东农业大学植物保护学院, 山东泰安 271018)

摘 要: 2004~2006 年, 在山东省的临淄、聊城、寿光、临沂等 12 个县市保护地栽培的西葫芦中发现一种严重危害茎基部的细菌性病害。从 22 批次 55 株西葫芦病株标本中, 经分离纯化获得 135 个菌株, 从中选出部分菌株按柯赫法则对其进行致病性测定, 均产生与田间相同症状。对病原菌形态、染色反应、培养性状和生理生化等几项试验结果表明, 病原菌为胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜软腐亚种 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*。

关键词: 西葫芦; 茎基部; 软腐病; 病原鉴定; 胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜软腐亚种

中图分类号: S 642.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 05-1189-06

Preliminary Studies on Etiology of Summer Squash Bacterial Soft Rot Disease

LI Lin¹, XU Zuo-ting¹, LI Chang-song^{1*}, QI Jun-shan¹, LI Fan¹, and ZHENG Ji-fa²

(¹ Institute of Plant Protection, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, China; ² College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: A bacterial disease was found on summer squash basal stems in protected vegetable fields of 12 counties in Shandong Province from 2004 to 2006. One hundred and thirty-five strains were isolated from 55 diseased plants. The pathogenicities of some strains showed that all these strains could cause the same symptoms as in the open field. The pathogen was identified as *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* based on the morphology, dyeing reaction, culture characteristics, physiological and biochemical tests.

Key words: Summer squash; Basal stem; Bacterial soft rot; Pathogenic identification; *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

近几年, 随着西葫芦保护地栽培面积的扩大, 一种主要发生在西葫芦茎基部的细菌性病害逐年加重。我们在山东省 12 个县市调查, 该病均有不同程度的发生, 尤以淄博市临淄区发生面积大, 危害严重, 成为影响当地西葫芦生产的突出问题之一。该病在植株长至 10~12 片叶时, 在植株下部伤口处开始发病, 发病速度快, 两周内植株大量死亡, 一般发病率 10%~20%, 严重的 30%~60%, 甚至全棚毁灭。

吕佩珂等 (1996) 和郑建秋 (2004) 报道西葫芦软腐病主要危害果实。而本文报道的这种病害主要在茎基部发生, 早期危害严重, 瓜条腐烂症状并不多见。

为了确定该病的病原, 摸清其发病规律, 从而制定切实可行的防治措施, 作者进行了病原菌分离、致病性测定和病原菌生理生化测定, 现将结果报道如下。

收稿日期: 2007-04-09; 修回日期: 2007-07-02

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2006BAD17B07, 2006BAD07B02)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: zbsbls@saas.ac.cn)

1 材料与方法

2004 ~ 2006 年, 从山东省临淄、寿光、青州、淄博、潍坊、阳谷、莘县、聊城、济南、平原、莒县和临沂等 12 个县市西葫芦大棚分批采集病株标本 22 批 55 株, 经表面消毒后, 采用平板划线法分离, 28 ~ 30℃ 恒温箱培养 48 h。挑取单个菌落纯化后, 将获得的菌株转接 NA 斜面培养 48 h, 4℃ 冰箱保存备用。

对照菌株为白菜软腐菌 E-321 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*), 由山东农业大学植保学院细菌研究室提供。

供试培养基为 NA 培养基、NB 培养基、金氏 B 培养基和 Logan 培养基。

病原细菌的分离培养、菌体形态观察、染色反应、培养性状观察、致病性测定和生理生化反应等试验, 参考方中达 (1998)、Schaad (1986)、中国科学院微生物研究所细菌分类组 (1978) 和王克 (1978) 的方法进行。

致病性测定采用注射法接种。供试西葫芦品种为 ‘玉帅’。待西葫芦幼苗长至三叶一心期, 将供试菌株在 NA 培养基上培养 48 h, 用灭菌水洗下菌苔, 配成浓度为 9.6×10^8 cfu/mL 的菌悬液, 在每株幼苗茎基部注射 0.2 ~ 0.5 mL 菌悬液。

每盆接种 8 ~ 10 株, 重复 3 次。以灭菌水为对照。将接种幼苗置于保湿箱内保湿 48 h。试验温度为 28℃。

2 结果与分析

2.1 症状特点

该病的鉴别性特征为主要危害植株的茎基部。发病初期, 病菌从西葫芦茎基部的表皮或伤口侵入, 在离地面 3 ~ 5 cm 的茎基部形成不规则水渍状褪绿斑, 逐渐扩大后呈黄褐色, 向内发展呈软腐状 (图 1), 或从地下根茎部侵入, 沿维管束向上侵染。

第 1 果穗开花期, 在去雄花后形成的伤口处或叶柄伤口处出现水浸状淡褐色病斑, 病部向上下扩展, 凹陷软化腐烂, 流出白色粘稠液并伴有恶臭, 后期随着病部扩展直至整株萎蔫死亡 (图 2), 病组织腐烂成麻状。



图 1 西葫芦软腐病症状

Fig. 1 The symptom of summer squash soft rot disease



图 2 西葫芦软腐病叶片萎蔫症状

Fig. 2 The wilt symptom caused by summer squash soft rot disease

2.2 病原菌的分离和致病性测定

采集的标本经分离纯化获得 135 个细菌菌株。其中软腐病菌 (*Erwinia* sp.) 112 株, 占 82.96%, 假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 23 株, 占 17.04%。选取临淄区皇城镇、寿光市田柳镇、青州谭坊镇、淄博市张店区房镇、安丘县临浯镇、阳谷县太平镇、聊城市东昌府区、济南市遥墙镇、临邑县理合乡、莒县刘官庄镇代表菌株, 编号为 EC-1 ~ EC-10。

致病性测定结果表明, 接种 *Erwinia* sp. 菌株发病后的西葫芦苗茎基部呈水渍状腐烂, 叶片萎蔫。接种 *Pseudomonas* sp. 的菌株和灭菌水的对照未见发病。从接种后初发病的幼苗茎基部再分离, 获得的细菌菌株均和原接种 *Erwinia* sp. 菌株性状相同。

2.3 病原菌的鉴定

2.3.1 菌体形态与染色反应

从分离纯化菌株中选出 10 个菌株, 在 NA 培养基上培养 24 h, 用磷钨酸负染电镜观察, 发现菌体为短杆状, 两端钝圆, 大小为 $1.3 \sim 2.8 \text{ nm} \times 0.5 \sim 1.0 \text{ nm}$, 鞭毛周生 (图 3)。按照革兰氏染色法和简易法 (郑继法, 1984) 区别, 各菌株均呈阴性反应, 不形成芽孢。

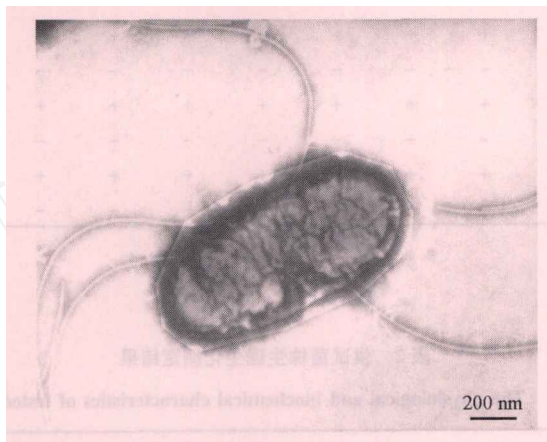


图 3 病原菌电镜照片

Fig. 3 Electron microscopy photograph of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

2.3.2 培养性状

将菌株在 NA 培养基平板上划线, 28℃ 恒温箱培养 48 h 后检查, 菌落污白色, 圆形, 边缘整齐, 有光泽, 稍隆起, 表面光滑, 菌落直径 2.2 ~ 3.1 mm。

在 NB 培养基培养, 培养液混浊, 沉淀产生菌膜。

在金氏 B 培养基上培养不产生荧光。

在 Logan 培养基上培养生长呈阳性反应。

生长最适温度为 25 ~ 30℃, 40℃ 以上不能生长。

2.3.3 生理生化测定结果

10 个供试菌株的生理生化反应和 E-321 菌株完全一致。19 种糖、醇及其他碳水化合物发酵测定结果 (表 1) 表明, 10 个供试菌株及对照菌株能利用葡萄糖、木糖、核糖醇、甘露醇等 13 种物质, 不能利用甜醇、核糖、丙二酸钠和酒石酸钾等。

耐盐性测定表明, 10 个供试菌株及对照菌株在 5% 氯化钠浓度下仍能生长, 对氧化酶、脲酶、卵磷脂酶等均呈阴性反应, 而对马铃薯软腐、明胶液化均呈阳性反应。供试菌株可产生 H_2S , 七叶灵水解阳性, 而甲基红、V. P. 试验、红霉素敏感性、 α -甲基葡萄糖苷等测定均呈阴性反应 (表 2)。

表 1 供试菌株对糖类、醇及其他碳水化合物的利用

Table 1 The results of utilization of saccharide, alcohols and other carbohydrates by isolated strains

测定项目 Testing items	EC-1	EC-2	EC-3	EC-4	EC-5	EC-6	EC-7	EC-8	EC-9	EC-10	E-321 (对照 Control)
麦芽糖 Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
乳糖 Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
纤维二糖 Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
木糖 D-Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
阿拉伯糖 Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
海藻糖 Fucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
核糖 Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
核糖醇 Adonitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
山梨醇 Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
甘露醇 Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
甜醇 Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肌醇 Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
水杨素 Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
丙二酸钠 Sodium malonate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
柠檬酸钠 Sodium citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
酒石酸钾 Tartrated kalium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
乳酸钠 Lactate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
淀粉水解 Starch hydrolyze	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注：+ 表示阳性；- 表示阴性。

Note: + Positive; - Negative.

表 2 供试菌株生理生化测定结果

Table 2 The physiological and biochemical characteristics of tested strains

测定项目 Testing items	EC-1	EC-2	EC-3	EC-4	EC-5	EC-6	EC-7	EC-8	EC-9	EC-10	E-321 (对照 Control)
氧化酶 Oxidase test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
过氧化氢酶 Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
脲酶 Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
卵磷脂酶 Lecithinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
苯丙氨酸脱氢酶 Phenylalanine dehydrogenase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S 产生 H ₂ S production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
七叶灵水解 Esculin hydrolyze	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
吲哚产生 Indole production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
甲基红 M. R. test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V. P. 试验 V. P. test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37℃ 生长 Growth at 37℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5% NaCl 生长 5% NaCl growth	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
马铃薯软腐 Potato soft rot	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
对红霉素敏感性 Susceptibility to erythromycin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-甲基葡萄糖苷 α-methyl-glycoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
厌氧生长 Anaerobic growth	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Logan 培养生长 Logan monoculture growth	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注：+ 表示阳性；- 表示阴性。

Note: + Positive; - Negative.

依据上述染色反应、致病性测定、培养性状和生理生化测定结果查对有关文献 (Buchanan & Gibbons, 1984; 任欣正, 1994; 吕佩珂 等, 1996; 王金生, 2000), 确定供试 10 个菌株均为胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜软腐亚种 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey et al.

3 讨论

本文报道的该细菌性病害主要为害西葫芦茎基部, 10~12 片叶时开始发病, 其侵害部位、病害发生时期和危害程度与文献报道的西葫芦软腐病有较大不同, 但二者均由胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜软腐亚种 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey et al 引起。

据报道, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 菌寄主范围很广, 可侵染葫芦科、十字花科、茄科、百合科、伞形花科、菊科等多种蔬菜, 主要为害甜瓜、西葫芦、节瓜的果实, 为害西葫芦茎基部的报道不多 (俞大维和方中达, 1956; 方中达和任欣正, 1981, 1992)。本研究为该病害的识别诊断和防控技术研究提供了科学依据。

根据近几年的调查, 该病在保护地栽培中有逐年加重的趋势。造成西葫芦茎基部软腐病危害加重的原因有以下几点, 一是随冬暖大棚连年种植西葫芦, 病原细菌逐年积累; 二是西葫芦开花结果初期人工去雄过程中易造成大量伤口; 三是冬暖大棚温度波动大, 湿度高, 更利于该病的发生蔓延。

该病的发病规律和防治研究正在进行中。

References

- Bacterial Classification Group of Institute of Microbiology, Academia Sinica. 1978. General bacterial identification methods. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 1978. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社.
- Buchanan R E, Gibbons N E. 1984. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. Baltimore: The Williams and Wilkins Company.
- Fang Zhong-da. 1998. Study methods of plant pathology. Beijing: China Agricultural Press; 162-210. (in Chinese)
- 方中达. 1998. 植病研究方法. 北京: 中国农业出版社: 162-210.
- Fang Zhong-da, Ren Xin-zheng. 1981. A supplement of China bacterial diseases. Journal of Nanjing Agricultural University, (3): 29-32. (in Chinese)
- 方中达, 任欣正. 1981. 中国植物细菌病名录补志. 南京农业大学学报, (3): 29-32.
- Fang Zhong-da, Ren Xin-zheng. 1992. A supplement of China bacterial diseases. Journal of Nanjing Agricultural University, 15 (4): 1-6. (in Chinese)
- 方中达, 任欣正. 1992. 中国植物细菌病名录补志. 南京农业大学学报, 15 (4): 1-6.
- Lü Pei-ke, Liu Wen-zhen, Duan Ban-suo, Zhang Bao-di. 1996. The continuation of atlas of insect pests and diseases of vegetable crops in China. Hohhot: Distance Press; 63-64. (in Chinese)
- 吕佩珂, 刘文珍, 段半锁, 张宝棣. 1996. 中国蔬菜病虫害原色图谱续集. 呼和浩特: 远方出版社: 63-64.
- Ren Xin-zheng. 1994. Classification and identification of plant pathogenic bacteria. Beijing: China Agricultural Press; 86-106. (in Chinese)
- 任欣正. 1994. 植物病原细菌的分类和鉴定. 北京: 中国农业出版社: 86-106.
- Schaad N W. 1986. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Translated by Zhang Ke-qin. Guizhou: Guizhou People's Press; 62-80. (in Chinese)
- Schaad N W. 1986. 植物病原细菌鉴定实验指南. 张克勤译. 贵州: 贵州人民出版社: 62-80.
- Wang Jin-sheng. 2000. Plant pathogenic bacteriology. Beijing: China Agricultural Press; 69-80. (in Chinese)
- 王金生. 2000. 植物病原细菌学. 北京: 中国农业出版社: 69-80.
- Wang Ke. 1978. Classification and identification of plant pathogenic bacteria. Shenyang: Shenyang Agricultural University; 67-82. (in Chinese)
- 王 克. 1978. 植物病原细菌分类鉴定. 沈阳: 沈阳农业大学: 67-82.
- Yu Da-fu, Fang Zhong-da. 1956. Preliminary list of China plant pathogenic bacteria. Journal of Agriculture, 7 (3): 299-363. (in Chinese)
- 俞大维, 方中达. 1956. 中国植物病原细菌的初步名录. 农业学报, 7 (3): 299-363.

- Zheng Ji-fa. 1984. The simple and fast experiments to distinguish gram-positive or gram-negative bacteria. Journal of Shandong Agricultural University, 15 (1): 1-2. (in Chinese)
- 郑继法. 1984. 区别格兰氏阴性菌和阳性菌的简易快速试验. 山东农业大学学报, 15 (1): 1-2.
- Zheng Jian-qiu. 2004. Handbook of contemporary vegetable pests and diseases: identification and management. Beijing: China Agricultural Press. (in Chinese)
- 郑建秋. 2004. 现代蔬菜病虫鉴定与防治手册. 北京: 中国农业出版社.

小菘菜花药培养获得再生植株

冯 辉*, 刘如娥, 王超楠, 李 丹 (沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110161)

Plant Regeneration of Greens Komatsuna via Anther Culture

FENG Hui*, LIU Ru-e, WANG Chao-nan, and LI Dan

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

关键词: 小菘菜; 花药培养; 单倍体育种

中图分类号: S 634.3 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2007) 05-1194-01

小菘菜, [*Brassica campestris* ssp. *chinensis* (L.) Makino] 在日本普遍栽培近年我国引进其多个品种。作者拟通过单倍体育种途径选育小菘菜新品种来加快育种进程。

以引自日本的小菘菜品种‘蕾用菜’(图版, A)为试材, 种子经春化处理穴盘育苗, 盆栽。开花后选取健壮植株花序, 选择小孢子发育处于单核靠边期至双核早期的花蕾(长 2.5~3.5 mm), 先用蒸馏水冲洗 30 min, 再用 75% 酒精消毒 30 s, 0.1% HgCl_2 溶液消毒 5 min, 无菌水冲洗 3 次, 每次 5 min。用灭过菌的镊子取出花药, 去除花丝, 接种到配制好的固体培养基上, 用 Parafilm 封口。经 33℃ 高温热激处理后, 置于 25℃ 恒温培养箱中暗培养, 直至出胚。

在 MS 和改良 B_5 培养基上培养 3 周, 获得了胚状体(图版, B), 两种培养基出胚率分别为 0.03 和 0.07 胚/蕾; 较好的变温处理组合为“低温 24 h + 高温 48 h”; 适宜蔗糖浓度为 10%。将 MS、 B_5 和改良 B_5 培养基有机成分加倍后, 出胚率明显提高。其中以改良 B_5 有机成分加倍的效果最好, 出胚率达到 0.27 胚/蕾, 说明在胚状体诱导中有机成分起重要作用。将上述改良 B_5 培养基的有机成分加倍后, 再分别添加不同浓度的谷氨酰胺和丝氨酸, 以谷氨酰胺 0.3 g/L 较好; 培养基中添加丝氨酸出胚率反而下降。经上述试验得到小菘菜‘蕾用菜’花药培养优化培养基配方为: 改良 B_5 + 2 倍改良 B_5 有机物 + 谷氨酰胺 0.3 g/L + 蔗糖 10% + 琼脂 0.8%。

将花药培养获得的子叶型胚转接到 MS 培养基上, 置于 25℃, 光照时间 12 h/d, 光照强度 6 000 lx 的培养室中培养。3~5 d 后, 胚状体开始变绿, 胚根伸长并长出根毛。在添加和不添加活性炭的培养基上诱导成苗均获得了成功, 但添加活性炭对胚状体发育有利, 幼苗生长较为健壮(图版, C)。



图版说明: A. ‘蕾用菜’小菘菜植株; B. 小菘菜花药培养 3 周后的胚状体; C. 小菘菜花药培养试管苗。

Explanation of plates: A. A plant of greens komatsuna; B. Embryoid from anther culture in three weeks in greens komatsuna; C. A regenerated plantlet of greens komatsuna from anther culture.

收稿日期: 2007-07-09; 修回日期: 2007-08-27

基金项目: 辽宁省优秀青年科研人才基金项目 (3040002)

* E-mail: fenghuiaaa@263.net