

孙齐英,夏明. 武汉蔬菜市场大白菜软腐病新病原菌鉴定[J]. 江苏农业科学,2020,48(15):141-143,211.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.15.024

# 武汉蔬菜市场大白菜软腐病新病原菌鉴定

孙齐英,夏明

(江汉大学生命科学学院,湖北武汉 430056)

**摘要:**在大白菜贮藏和运输期间极易受真菌、细菌等微生物侵染而导致软腐病,鉴定软腐病的病原菌是防治大白菜软腐病的重要前提。对武汉市洪山区白沙洲蔬菜市场大白菜软腐病进行病原鉴定。从大白菜软腐病病部分离并培养病原物,并进行形态观察、生理生化鉴定、回接试验、致病性试验及基因测序。结果表明,大白菜软腐病的病原菌菌株 S3 菌落为灰白色,圆形,中部稍隆起,边缘呈半透明状;菌体为杆菌,革兰氏阴性菌;不产酸,不能分解色氨酸、产生吲哚,甲基红(M. R.)试验为阴性,乙酰甲基甲醇(V. P.)试验为阴性,不产  $H_2S$ ,容易从伤口侵入。与假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)细菌的 16S rDNA 序列的一致性为 99.40%,说明该病原为假单胞菌属。

**关键词:**大白菜;16S rDNA;软腐病;病原菌;假单胞菌属;鉴定

**中图分类号:** S436.341.13 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)15-0141-03

受副热带高压控制,湖北武汉夏季呈现出气温高、湿度大、时间长等特点,加上大白菜在运输途中由于挤压、碰撞形成伤口,极易在短时间内发生大面积软腐病,损失极大,严重影响大白菜市场供应<sup>[1]</sup>。一般认为,大白菜软腐病病原菌是胡萝卜软腐欧式杆菌(*Erwinia carotovora* var. *carotovora*)<sup>[2-4]</sup>。本研究从武汉市蔬菜批发市场成功分离出大白菜软腐病的病原菌,采用形态观察、生理生化试验以及分子鉴定,确定为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.),与前人报道的大白菜软腐病病原菌为胡萝卜软腐欧式杆菌不同,这为大白菜软腐病防治提供了依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 受检作物** 当季的黄心大白菜(来自武汉市洪山区白沙洲农副产品大市场,产地多为湖北省周边城市及海南省),分别挑选健康和已经腐烂的叶球若干。

**1.1.2 主要试剂** 试验主要试剂有 LB(Luria-Bertani)固体培养基(1 L)、LB 液体培养基(1 L)、葡萄糖蛋白胨水培养基(1 L)、硫酸亚铁琼脂培养基

(SIM 培养基)、蛋白胨水培养基(1 L)、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、10 × Buffer、5 × TBE、溴化乙锭(EB)染料、草酸铵结晶紫染液、番红染液。

**1.1.3 主要仪器** 试验主要仪器有高压灭菌锅、光学显微镜、超净工作台、摇床、生化培养箱、气候培养箱、聚合酶链式反应(PCR)仪、电泳仪、水平电泳槽、凝胶成像分析系统。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 大白菜软腐病的症状肉眼观察试验** 肉眼观察大白菜软腐病的病状和病症,观察发病部位。

**1.2.2 病原菌的分离与纯培养** 取腐烂的大白菜组织冲洗 10 min,沥干水分,将大白菜组织切成小块,乙醇浸泡 30 s,冲洗 2~3 次,加入 0.1% 次氯酸溶液浸泡 10 min,冲洗 2~3 次,加入 50 mL 无菌水,用滴管抽打成含有菌体的悬浊液。取 1 mL 细菌溶液用无菌水稀释并涂布在 LB 固体培养基上,28 ℃ 避光培养 2~3 d。再挑选优势菌落在 LB 固体培养基上划线培养,28 ℃ 避光培养 24~48 h,重复划线操作直至得到单菌落,观察其菌落形态。

**1.2.3 病原菌的回接试验** 将获得的 3 株单菌落(S1、S2、S3)接种到 LB 液体培养基并置于 28 ℃、140 r/min 的摇床中避光培养 16~24 h,离心收集细菌,用无菌水配制成  $3 \times 10^8$  CFU/mL 悬浮液。

取健康的大白菜叶片,将叶柄部分切成 4 cm × 4 cm 方形小块,放入烧杯中,加 75% 乙醇浸泡 30 s,无菌水冲洗 2~3 次,用 0.1% 次氯酸溶液浸泡 10 min,无菌水冲洗 2~3 次。无菌纸吸干水分,参

收稿日期:2019-10-08

基金项目:国家自然科学基金(编号:31900095)。

作者简介:孙齐英(1966—),男,湖北武汉人,硕士,副教授,从事微生物教学科研工作。E-mail:937630248@qq.com。

照 Hu 等的方法<sup>[5]</sup>接种 3 种单菌落菌液,再将其分别置于空培养皿(垫有滤纸)中,无菌水接种作为对照。培养皿用封口膜密封,置于 28 ℃、80% 湿度气候培养箱中培养,每天观察发病情况。

1.2.4 病原菌的致病性鉴定 选取有致病作用的 S3,按“1.2.3”的方法制成  $3 \times 10^8$  CFU/mL 细菌悬浮液。用注射器取 0.5 mL 液体喷洒健康的大白菜叶柄表面(形成悬浮滴为宜)进行离体接种试验。

试验分 5 个处理:不划伤口,取 0.5 mL LB 液体培养基直接喷洒叶柄表面,光照条件下培养(处理 1);叶柄划长约 1 cm、深 3 mm 伤口,LB 液体培养基喷洒叶柄伤口表面,光照条件下培养(处理 2);不划伤口,取 0.5 mL S3 液体培养基直接喷洒叶柄表面,光照条件下培养(处理 3);划伤口,S3 液体培养基喷洒叶柄伤口表面,光照条件下培养(处理 4);划伤口,S3 液体培养基喷洒叶柄伤口表面,黑暗条件下培养(处理 5)。28 ℃ 保湿培养,每天观察发病情况。

1.2.5 病原菌的形态观察及生理生化鉴定

1.2.5.1 革兰氏染色反应和形态观察 参照文献[6]进行病原菌的革兰氏染色和形态观察。将获得的 S3 单菌落在 LB 液体培养基中进行扩大化培养,置于 28 ℃、140 r/min 的摇床中避光培养 16~24 h。用滴管吸取菌液,经草酸铵结晶紫染液初染,乙醇脱色,番红染液复染后于 100 倍油镜下观察形态。

1.2.5.2 生理生化鉴定 对 S3 菌株进行生理生化鉴定,鉴定项目包括 H<sub>2</sub>S 试验、V. P. 试验(伏-普试验)、M. R. 试验(甲基红试验)、吡啶试验,具体方法参照《微生物学实验》<sup>[7]</sup>。

1.2.6 16S rDNA 鉴定 将纯化后的菌株接种在 LB 液体培养基中,于 28 ℃ 下培养 16~24 h,离心,收集菌体,提取细菌基因组,得到 DNA 模板,通过 16S rDNA 通用引物(27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和 1492 R:5'-GGTTACCTTGTTACGAC TT-3')进行 PCR 扩增,随后在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳并观察结果,将条带单一的 PCR 样品送至武汉天一辉远生物科技公司进行测序,随后将测序结果在 NCBI 上进行序列比对以确定致病菌。PCR 体系:由 dNTPs、Taq DNA 聚合酶、10 × buffer、Mg<sup>2+</sup> 混合成的 2 × Mix 12.5 μL,上下游引物各 1 μL, DNA 模板 1 μL,剩余用 ddH<sub>2</sub>O 补齐至 25 μL。PCR 反应程序:95 ℃ 预变性 10 min;95 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,重复循环 25 次;72 ℃ 延伸 10 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 大白菜软腐病的症状肉眼观察结果

肉眼观察到大白菜软腐病的症状为受到侵染的植物组织最初成半透明水渍状,随着病斑的不断扩大造成叶球中心靠近茎基部大面积软腐,并且散发恶臭。病斑为黄褐色,表皮完整,撕破表皮有黄褐色黏液流出(图 1)。



图1 大白菜软腐病症状

### 2.2 病原菌的分离与菌落观察结果

从病组织中分离纯化培养出 3 种类型的菌落: S1 菌落,形态为浅黄色,圆形,光下成半透明状; S2 菌落,形态为白色圆形,光下成半透明状; S3 菌落,形态为灰白色圆形,比 S2 略大,光下中心部分稍隆起不透明,周围半透明(图 2)。



图2 LB 固体培养基上的菌株培养 5 d

### 2.3 病原菌的回接试验结果

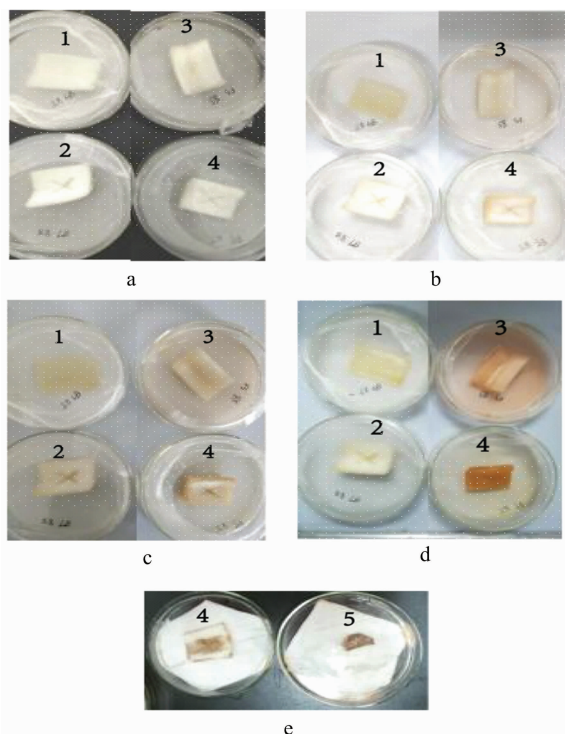
回接试验结果显示,从病组织分离出的 S3 接种健康的大白菜小块培养 1 d 后,接种处出现明显的水渍状病斑,并逐步向外扩散;2 d 后症状加重,病斑变为深褐色,表皮与内部组织分离;7 d 后,整个

大白菜小块皱缩成黑色小块。S1、S2、对照在培养 7 d 后除接种处出现黑黄色愈合伤疤,其他正常。说明 S3 引起大白菜健康组织明显软腐病变,与肉眼观察的大白菜软腐病的典型症状相同,可以初步断定 S3 为病原菌。

#### 2.4 病原菌的致病性鉴定结果

由图 3 可以看出,处理 4 发病状况最为严重,2 d 病组织出现明显黄褐色,叶肉和表皮组织分离现象,变得不透明,4 d 全部腐烂坏死,7 d 植物组织崩溃。处理 3 直到 4 d 才出现黄褐色,发生病变的程度比处理 4 明显要轻,处理 1、2 整个试验期没有病变。说明大白菜软腐病病菌的容易从伤口侵入。

图 3 中 e 为处理 4、5 接种 5 d 后发病情况的症状对比,可以看出,处理 5 在第 5 天组织完全倒塌,缩成黑色小块,发病程度明显比处理 4 严重。说明病原菌在光照条件下致病力比黑暗条件下更强。



1—处理 1, 不切口+LB; 2—处理 2, 切口+LB; 3—处理 3, 不切口+S3 菌液; 4—处理 4, 切口+S3 菌液; 5—处理 5, 光照条件+S3 菌液。a、b、c、d 分别为接种 1、2、4、7 d 的大白菜叶柄表面发病情况

图3 病原菌致病性鉴定试验观察结果

#### 2.5 S3 菌株的生理生化鉴定与形态观察结果

从 S3 菌株生理生化试验结果表明,甲基红试验 (M. R.) 为阴性,乙酰甲基甲醇试验 (V. P.) 为阴性,吡啶试验为阴性,不产  $H_2S$ 。S3 为革兰氏阴性菌,油镜下观察发现,该菌为短杆状,长度为  $0.625 \sim$

$1.25 \mu m$ ,有微弱运动性(图 4),符合植物病原细菌假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 形态和生理生化特征<sup>[2]</sup>。

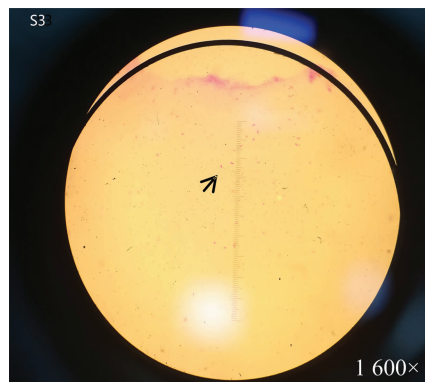


图4 S3 菌株革兰氏染色结果

#### 2.6 病原菌的 PCR 鉴定

通过对 S3 菌株的 16S rDNA 进行 PCR 扩增得到单一条带并进行测序,该序列在 NCBI 上进行比对分析以初步鉴定目标菌株。测序结果表明,S3 菌株与假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) 细菌的 16S rDNA 序列的一致性为 99.40%,推断 S3 菌株为假单胞菌属细菌。

### 3 讨论与结论

本研究通过对武汉蔬菜市场的大白菜软腐病的致病菌进行分离并对其进行形态学观察、生理生化鉴定及致病性试验,结果显示,该病原物与假单胞杆菌的特征一致,16S rDNA 的测序结果进一步显示该菌与假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp.) 细菌的 16S rDNA 序列的一致性为 99.40%,因此可以认定引起大白菜软腐病的 S3 菌株为假单胞属细菌。一般认为,假单胞属细菌主要导致植物叶枯型、叶斑型或青枯型病害,而软腐型病害主要由胡萝卜软腐欧文氏杆菌引起<sup>[2]</sup>,但也有试验发现,假单胞杆菌属可以导致植物软腐病,如格氏假单胞菌 (*P. grimontii*) 引起蝴蝶兰软腐病<sup>[2]</sup>,恶臭假单胞菌 (*P. putida*) 引起番茄软腐病<sup>[8]</sup>,荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) 引起黄瓜茎软腐病,边缘假单胞菌 (*P. marginalis*) 可以引起马铃薯茎块<sup>[9]</sup>、马蹄莲<sup>[10]</sup>、百合<sup>[11]</sup>等软腐病,边缘假单胞菌和白枯病假单胞菌引起葱属植物叶片软腐病<sup>[12]</sup>,假单胞菌属细菌引起魔芋软腐病<sup>[13]</sup>。本研究也说明胡萝卜软腐欧文氏杆菌不是引起软腐病的唯一原因。

一般认为,从自然孔口侵入的植物病原细菌更容易从伤口侵入<sup>[2]</sup>,本试验也证实假单胞杆菌可以

(下转第 211 页)

高水分利用效率和环境适应能力。

盛花期喷施赤霉素处理可极显著提高灰枣坐果率,该结果与史彦江等的研究结果<sup>[3,6,11]</sup>基本一致。不同浓度赤霉素处理的坐果率均高于对照,其中 T2 处理的坐果率与对照相比提高 6.04 个百分点左右。因此,喷施 20 mg/L 赤霉素对提高灰枣坐果率效果较好。

由此可见,赤霉素的施用浓度并不是越高越好,在生产上,建议喷施浓度控制在 20 mg/L 左右,同时在灰枣花期和坐果期配合喷施叶面肥等,增加树体营养供应,从而更加有效地促进光合作用,增加枣体内有机物质的积累,稳定产量,进而提高经济效益。

#### 参考文献:

- [1] 刘孟军,汪 民. 中国枣种质资源[M]. 北京:中国林业出版社, 2009:10-11.
- [2] 朱 锐. 新疆枣树栽培适宜品种及关键技术的调查研究[D]. 北京:北京林业大学,2010.
- [3] 史彦江,吴正保,哈地尔·依沙克,等. 叶面喷施肥料和生长调节剂对阿克苏市骏枣的产量和品质的影响[J]. 中国土壤与肥料, 2012(6):66-69.
- [4] 宋丽华,曹 兵,吕文玮. ALA 对设施灵武长枣光合作用与坐果的影响[J]. 西北林学院学报,2013,28(6):37-41.
- [5] 曹柳青,贾晓梅,温陟良. 赤霉素对冬枣光合特性的影响及其持续期的研究[J]. 中国果树,2013(6):44-46.

(上接第 143 页)

从自然孔口侵入,但更容易从伤口侵入,2 d 即可发病,其发病迅速,建议在大白菜运输和贮藏的过程中要尽量避免因挤压、碰撞等造成伤口。

软腐病是由于细菌分解果胶酶裂解植物细胞中胶层引起,胡萝卜软腐欧式杆菌可以产生果胶酶导致软腐<sup>[14]</sup>,假单胞杆菌一般产生植物毒素导致坏死<sup>[2]</sup>,其引起软腐的致病机制有待进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] 孙淑敏,孙路敏. 大白菜软腐病的发病原因及其综合防治[J]. 河北农业,2016(10):32-34.
- [2] 方中达. 普通植物病理学[M]. 南京:江苏人民出版社,1959: 83-94.
- [3] 郑学立,谢鑫鑫,邵贵荣,等. 不结球白菜“福冠”软腐病病原鉴定[J]. 亚热带农业研究,2018,14(1):48-54.
- [4] 李晓颖,田 宇,张 瑾,等. 大白菜软腐病新病原菌 *Pectobacterium atrosearum* 的鉴定及其生物学特征[J]. 植物病理学报,2018,48(4):455-465.
- [5] Hu N N, Li C, Wang Q, et al. Identification of soft rot pathogens on Chinese cabbage [*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino

- [6] 宋丽华,万仲武,曹 兵. 不同药剂处理对灵武长枣坐果与光合指标的影响[J]. 经济林研究,2016,34(1):40-44.
- [7] 郑强卿,陈奇凌,李 铭,等. 复混型植物生长调节剂对骏枣光合特性及品质构成因素的影响[J]. 安徽农业科学,2015,43(28): 35-38,69.
- [8] 郭 明,吴翠云,蒋 卉,等. 赤霉素对骏枣、灰枣叶片发育及果实品质的影响[J]. 塔里木大学学报,2012,24(3):40-45.
- [9] 马俊青,宋宏伟,卢绍辉,等. 喷施赤霉素对灰枣生理及品质的影响[J]. 河南林业科技,2015,35(3):6-9.
- [10] 王长丽. 不同施肥处理及喷施赤霉素对灰枣生理与坐果率影响研究[D]. 郑州:河南农业大学,2012.
- [11] 彭 刚,梁 刚,杨艺渊,等. 生长调节剂对灰枣产量和果实品质的影响[J]. 中国南方果树,2016,45(1):95-97.
- [12] 徐 斌,白克力·塔西铁木尔,车风斌,等. 不同温度环境下灰枣光合特征日变化的研究[J]. 新疆农业科学,2015,52(12): 2222-2229.
- [13] 焦绪娟. 几个杨树杂交无性系抗逆性研究与评价[D]. 泰安:山东农业大学,2007.
- [14] 郑淑霞,上官周平. 8 种阔叶树种叶片气体交换特征和叶绿素荧光特性比较[J]. 生态学报,2006,26(4):1080-1087.
- [15] 王润佳,高世铭,张绪成. 高大气 CO<sub>2</sub> 浓度下 C<sub>3</sub> 植物叶片水分利用效率升高的研究进展[J]. 干旱地区农业研究,2010,28(6):190-195.
- [16] 张述斌,徐崇志,张 锐,等. 遮阴对‘温 185’核桃光合特性的影响[J]. 中国果树,2017(3):22-27.
- [17] 段义忠,张 雄,亢福仁,等. 不同绿豆品种光合特性及水分利用效率研究[J]. 陕西农业科学,2014,60(9):1-7.

var. *communis* Tsenet Lee] in Beijing (in Chinese) [J]. Acta Microbiological Sinica,2015,55(10):1253-1263.

- [6] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1998:76-81.
- [7] 范秀容,沈 萍. 微生物学实验[M]. 北京:人民教育出版社, 1980:119-123.
- [8] 褚晓玲,杨 波. 蝴蝶兰软腐病中一种新致病菌的分离与鉴定[J]. 植物病理学报,2010,40(1):90-94.
- [9] 代晓航,魏 超,郭灵安. 16S rDNA 方法对新鲜番茄中细菌分布的调查[J]. 西南农业学报,2015,28(2):797-800.
- [10] 甘琴华,厉 艳,邵秀玲,等. 边缘假单胞菌的分离鉴定及其特性[J]. 植物保护学报,2011,38(2):183-184.
- [11] 厉 艳,魏晓棠,甘琴华,等. 入境马蹄莲细菌性软腐病菌的分离鉴定[J]. 食品安全质量检测学报,2014(12):3944-3946.
- [12] Hahm S S, Han K S, Shim M Y, et al. Occurrence of bacterial soft rot of lily bulb caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* and *Pseudomonas marginalis* in Korea [J]. The Plant Pathology Journal,2003,19(1):43-45.
- [13] Wright P J, Grant D G. Evaluation of *Allium* germplasm for susceptibility to foliage bacterial soft rot caused by *Pseudomonas marginalis* and *Pseudomonas viridiflava* [J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science,1998,26(1):17-21.
- [14] 王 成. 胡萝卜软腐果胶杆菌代谢网络构建及杀菌剂靶标初筛 [D]. 武汉:华中农业大学,2013:22.