

# 大白菜软腐菌种群组成及优势菌致病型的研究

臧威<sup>1,2</sup>, 张耀伟<sup>2</sup>, 孙剑秋<sup>1</sup>, 崔崇士<sup>2,①</sup>

(1. 齐齐哈尔大学生命科学与工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 东北农业大学园艺学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** 对黑龙江省成熟大白菜 [*Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr.] 生产田采集的软腐病菌进行分离、纯化, 并根据形态学特征分析了大白菜软腐病菌的种群组成。结果表明, 引起黑龙江省秋季大白菜软腐病的主要致病菌是胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜软腐亚种 [*Erwinia carotovora* (Jones) Bergey et al. subsp. *carotovora*] (*Ecc*); 利用 20 个 *Ecc* 菌株的混合菌对来源于不同生态型及不同地区的大白菜品种进行接种, 筛选出 5 个鉴别寄主, 以此将 20 个 *Ecc* 菌株划分为 5 个致病力类型, 其中 V 型为优势致病菌, 其分布广且致病力强。

**关键词:** 大白菜; 软腐病菌; 种群; 致病力; 鉴别寄主

**中图分类号:** S436.341.1<sup>3</sup> **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2006)01-0026-04

**Study on population structure and dominant pathogenic types of soft rot bacteria in *Brassica pekinensis*** ZANG Wei<sup>1,2</sup>, ZHANG Yao-wei<sup>2</sup>, SUN Jian-qi<sup>1</sup>, CUI Chong-shi<sup>2,①</sup> (1. Life Scientific and Engineering College of Qiqihar University, Qiqihar 161006, China; 2. Horticultural College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2006, 15(1): 26-29

**Abstract:** Soft rot bacteria from *Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr. in Heilongjiang Province were isolated and purified to analyze the population structure of soft rot bacteria by morphologic characteristics. The results indicated that the main pathogenic bacteria in *B. pekinensis* was *Erwinia carotovora* (Jones) Bergey et al. subsp. *carotovora* (*Ecc*). Different *B. pekinensis* strains were inoculated with twenty mixed strains of *Ecc* and five differential hosts were screened, by which twenty strains of *Ecc* were classified into five pathogenic types. Type V was dominant pathogenic bacteria and had general distribution and strong pathogenicity.

**Key words:** *Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr.; soft rot bacteria; population; pathogenicity; differential host

软腐病是黑龙江省春、夏、秋季大白菜 [*Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr.] 生产的三大病害之一, 在大白菜生产后期和冬季贮藏期经常发生<sup>[1]</sup>, 有的年份或地块危害严重, 造成较大的经济损失。目前生产上防治软腐病经济又安全有效的途径依然是培育抗病新品种, 但大白菜软腐病菌原菌种群、致病力分化尚不明确。由于研究方法上的困难, 抗软腐病育种研究工作滞后, 抗软腐病品种比较少, 有关基础研究需加强。笔者分析了黑龙江省大白菜软腐病菌的种群组成, 筛选出一套鉴别寄主, 并对黑龙江省软腐病菌优势种群进行致病力划分, 以期为今后大白菜抗软腐病育种工作提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 种群分析用菌株 于 2001 年、2002 年 9 月底和 10 月上旬在黑龙江省哈尔滨、牡丹江、齐齐哈尔、佳木斯、鸡西、鹤岗、双鸭山等地市及郊区县成熟大白菜生产田, 采集发病菜帮 300 余份作为软腐

收稿日期: 2005-07-19

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”)项目资助(NO2004AA241120)

作者简介: 臧威(1975-), 女, 黑龙江依安人, 博士研究生, 讲师, 主要从事植物病理学的研究。

① 通讯作者

病病样本,将其装入纸袋中备用。经结晶紫果胶酸盐培养基(CVP)<sup>[2,3]</sup>分离、纯化及形态学和柯赫氏法则鉴定为软腐欧文氏杆菌。

1.1.2 致病力划分用菌株 20个具代表性的软腐病菌*Ecc*菌株分别为*Ecc*-1-0、*Ecc*-1-3、*Ecc*-1-4、*Ecc*-1-6、*Ecc*-1-9、*Ecc*-1-13、*Ecc*-1-15、*Ecc*-1-16、*Ecc*-2-1、*Ecc*-2-2、*Ecc*-2-5、*Ecc*-3-3、*Ecc*-3-4、*Ecc*-3-6、*Ecc*-4-0、*Ecc*-4-1、*Ecc*-5-1、*Ecc*-5-2、*Ecc*-5-6、*Ecc*-5-7。上述菌株等比例混合后作为筛选鉴别寄主的混合菌。

1.1.3 鉴别寄主大白菜品种<sup>[4]</sup> 选用全国各地推广使用的大白菜杂交一代和大白菜品种20个,分别为‘高抗一号’、‘秋绿60’、‘高抗二号’、‘西白四号’、‘秋绿75’、‘郑杂二号’、‘绿丰75’、‘龙白二号’、‘北京小杂56号’、‘83-24’、‘东白一号’、‘北京新一号’、‘秦白四号’、‘翻心菜’、‘大白菜19号’、‘秦白二号’、‘586新世纪’、‘郑白四号’、‘春夏王白菜’和‘快春’。

## 1.2 菌株种群分析的生理生化特性测定<sup>[2,5]</sup>

1.2.1 37℃生长反应 菌株在YS培养液中于37℃恒温水浴培养24~48 h,用比浊法测定生长量。

1.2.2 耐盐性 菌株在含有5% NaCl的YS培养液中于28℃培养1~14 d,用比浊法测定生长量。

1.2.3 碳水化合物的利用 菌株碳水化合物利用的培养液含NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g、KCl 0.2 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g、蒸馏水1 L、1.6%溴百里酚蓝酒精溶液1 mL作指示剂,pH 7.0,高温灭菌。测定的碳源(麦芽糖)1.0 g灭菌后加入培养液中,最终浓度为1%,培养1~14 d后,用比浊法测定生长量。

## 1.3 接种方法<sup>[6]</sup>

在大白菜的幼苗期,当第6片真叶充分展开时取离体叶片,采用针刺法,将菌接种于叶柄上,菌悬液浓度为10<sup>7</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>,于28℃、9 000 lx光照培养箱内保湿2 d,每天光照12 h。每个处理12株,对照则不接种菌,实验设3次重复。5 d后进行病情调查。

## 1.4 病情调查

1.4.1 病情分级<sup>[7]</sup> 按设定的标准进行病情分级。0级:接种点无侵染病症;1级:病斑刚开始形成,呈水浸状;3级:病斑已产生而长度小于1 cm;5级:病斑长度大于1 cm而小于2 cm;7级:病斑长度大于

2 cm;9级:叶柄大部或全部腐烂。

1.4.2 病情指数计算 采用常用的公式 $H = 100 \times [(P \times L) / (ML \times TP)]$ 计算病情指数。式中, $H$ 为病情指数; $P$ 为各级发病株数; $L$ 为病级; $ML$ 为最高发病级数; $TP$ 为调查株数。

1.4.3 抗原筛选的抗性归类<sup>[7]</sup> 根据计算出的病情指数( $H$ ),按下列等级进行抗性归类。免疫(I): $H$ 为0;高抗(HR): $0 < H \leq 11.11$ ;抗病(R): $11.11 < H \leq 33.33$ ;中抗(MR): $33.33 < H \leq 55.55$ ;感病(S): $55.55 < H \leq 77.77$ ;高感(HS): $77.77 < H \leq 100.00$ 。

## 2 结果和分析

### 2.1 大白菜软腐病菌种群分析

大白菜软腐病菌种群在黑龙江省各地分布比例见表1。在黑龙江省哈尔滨、齐齐哈尔、牡丹江、佳木斯等8个地市区的40个地块上采集的软腐病病样300余份经分离纯化及病原菌形态与生理生化特性测定,鉴定为3种欧文氏菌,即胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜软腐亚种[*Erwinia carotovora* (Jones) Bergey et al. subsp. *carotovora*](*Ecc*)<sup>[8]</sup>、胡萝卜软腐欧文氏菌黑胫亚种(*E. carotovora* subsp. *atroseptica*)(*Eca*)<sup>[9]</sup>、菊欧文氏菌(*E. chrysanthemi* Burkholder, McFadden et Dimock)(*Ech*)<sup>[10]</sup>。3种病菌经柯赫氏法则回接后,均产生明显的病症,说明这3种病菌都是大白菜软腐病的致病菌。胡萝卜软腐亚种的比例最大,占75%~90%;黑胫亚种和菊欧文氏菌出现的比率很小,其中*Eca*占4%~15.79%,*Ech*占3.57%~16.67%。实验表明,黑龙江省秋季大白菜软腐病的主要致病菌是胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜软腐亚种,进行大白菜软腐病的研究应以此菌为主。

### 2.2 鉴别寄主筛选

20个大白菜品种接种混合菌株后,抗感反应见表2。

来源于不同生态型、不同地区的20个大白菜品种抗感反应不同,抗性级别从高抗到高感。通过鉴定筛选出高抗(HR)材料1份,为‘高抗一号’;抗病(R)材料1份,为‘秋绿60’;中抗(MR)材料10份;感病(S)材料6份;高感(HS)材料2份,为‘快春’和‘春夏王白菜’。根据大白菜品种的抗感反应,可以初步筛选出‘高抗一号’、‘秋绿60’、‘龙白二号’、

‘秦白二号’、‘快春’等5个品种组成的一套来源于不同地区、不同生态型的鉴别大白菜软腐病菌分化的鉴别寄主。

2.3 大白菜软腐病菌致病力类型的划分

利用筛选出的5个鉴别寄主,将从黑龙江省各

地采集的20个典型菌株接种于其上,结果见表3。20个典型菌株可划分为5个致病力类型。

在这5个致病力类型中,V型的比例最大,分布较广,在黑龙江省各地均存在,而且其致病力最强,为优势致病菌。

表1 黑龙江省大白菜软腐病菌种群分析<sup>1)</sup>

Table 1 Analysis of population structure of soft rot bacteria from *Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr. in Heilongjiang Province<sup>1)</sup>

地区 District	<i>Ecc</i>		<i>Eca</i>		<i>Ech</i>	
	比例/% Proportion	份数 Number	比例/% Proportion	份数 Number	比例/% Proportion	份数 Number
哈尔滨 Harbin	90.00	50	6.00	50	4.00	50
齐齐哈尔 Qiqihar	89.29	40	7.14	40	3.57	40
牡丹江 Mudanjiang	76.19	30	14.29	30	9.52	30
佳木斯 Jiamusi	75.00	30	8.33	30	16.67	30
鸡西 Jixi	78.95	20	15.79	20	5.26	20
双鸭山 Shuangyashan	90.00	20	5.00	20	5.00	20
鹤岗 Hegang	80.00	30	6.67	30	13.33	30
伊春 Yichun	84.00	20	4.00	20	12.00	20

<sup>1)</sup> *Ecc*: 胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜软腐亚种 *Erwinia carotovora* (Jones) Bergey et al. subsp. *carotovora*; *Eca*: 胡萝卜软腐欧文氏菌黑胫亚种 *E. carotovora* subsp. *atroseptica*; *Ech*: 菊欧文氏菌 *E. chrysanthemi* Burkholder, McFadden et Dimock.

表2 不同大白菜品种对大白菜软腐病混合菌株的抗感反应

Table 2 Resistant and infectious reaction of different varieties of *Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr. to mixed soft rot bacteria strains

品种 Variety	病情指数 Disease index	致病力 <sup>1)</sup> Pathogenicity <sup>1)</sup>	品种 Variety	病情指数 Disease index	致病力 <sup>1)</sup> Pathogenicity <sup>1)</sup>
CK	0.00	I	东白一号 Dongbaiyihao	53.75	MR
高抗一号 Gaokangyihao	10.89	HR	北京新一号 Beijingxinyihao	54.98	MR
秋绿 60 Qiulu 60	32.47	R	秦白四号 Qinbaisihao	55.81	S
高抗二号 Gaokangerhao	34.81	MR	翻心菜 Fanxincai	57.28	S
西白四号 Xibaisihao	38.00	MR	大白菜 19 号 Dabaicai 19 hao	59.30	S
秋绿 75 Qiulu 75	41.19	MR	秦白二号 Qinbaierhao	62.52	S
郑杂二号 Zhengzaerhao	43.24	MR	586 新世纪 586 Xinshiji	65.74	S
绿丰 75 Lufeng 75	47.33	MR	郑白四号 Zhengbaisihao	68.43	S
龙白二号 Longbaierhao	47.57	MR	春夏王白菜 Chunxiawangbaicai	77.80	HS
北京小杂 56 号 Beijingxiaozha 56 hao	50.62	MR	快春 Kuaichun	78.13	HS
83-24	51.90	MR			

<sup>1)</sup> I: 免疫 Immune; HR: 高抗 High Resistant; R: 抗病 Resistant; MR: 中抗 Middle Resistant; S: 感病 Susceptible.

表3 黑龙江省大白菜软腐病菌致病力类型划分<sup>1)</sup>

Table 3 Pathogenic types of soft rot bacteria in *Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr. in Heilongjiang Province<sup>1)</sup>

类型 Type	不同白菜品种的致病力 Pathogenicity in different varieties					菌株 Strain
	高抗一号 Gaokangyihao	秋绿 60 Qiulu 60	龙白二号 Longbaierhao	秦白二号 Qinbaierhao	快春 Kuaichun	
I	R	R	R	R	S	<i>Ecc</i> -1-13, <i>Ecc</i> -2-1, <i>Ecc</i> -4-1, <i>Ecc</i> -3-6
II	R	R	R	S	S	<i>Ecc</i> -1-9, <i>Ecc</i> -1-15, <i>Ecc</i> -5-1, <i>Ecc</i> -5-7
III	R	R	S	S	S	<i>Ecc</i> -1-3, <i>Ecc</i> -1-16, <i>Ecc</i> -2-5
IV	R	S	S	S	R	<i>Ecc</i> -1-6, <i>Ecc</i> -5-2, <i>Ecc</i> -3-4
V	R	S	S	S	S	<i>Ecc</i> -1-0, <i>Ecc</i> -1-4, <i>Ecc</i> -2-2, <i>Ecc</i> -4-0, <i>Ecc</i> -5-6, <i>Ecc</i> -3-3

<sup>1)</sup> R: 抗病 Resistant; S: 感病 Susceptible; *Ecc*: 胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜软腐亚种 *Erwinia carotovora* (Jones) Bergey et al. subsp. *carotovora*.

## 2.4 不同类型的软腐病菌的分布

不同地区、不同类型的大白菜软腐病菌分布情况详见表4。

黑龙江省各地区大白菜软腐病菌致病力类型的组成在各个地区中以哈尔滨市最多,佳木斯市最少,表明致病力类型组成情况可能与当地的大白菜品种布局和气候有关,这也为品种合理布局从而减轻软腐病的发生提供了一个可能。

表4 大白菜软腐病5个致病力类型在黑龙江省各地的分布情况  
Table 4 Distribution of five pathogenic types of soft rot bacteria in *Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr. in Heilongjiang Province

地区 District	致病力类型 <sup>1)</sup> Pathogenic type <sup>1)</sup>
哈尔滨 Harbin	I、II、III、IV、V
齐齐哈尔 Qiqihar	I、III、V
牡丹江 Mudanjiang	I、IV、V
佳木斯 Jiamusi	I、V
鸡西 Jixi	II、IV、V

<sup>1)</sup> I - V:致病力依次增强 Pathogenicity strengthens successively

## 3 讨 论

通过对黑龙江省秋季大白菜软腐病病原种群进行分析,可初步确认黑龙江省秋季大白菜软腐病菌有胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜软腐亚种、胡萝卜软腐欧文氏菌黑胫亚种及菊欧文氏菌3种菌源,其中主要以胡萝卜软腐亚种为主,这与王慧敏等人<sup>[11]</sup>的调查结果相似。因此,在黑龙江省进行大白菜抗软腐病鉴定时,应以胡萝卜软腐亚种为主。近年来春结球大白菜生产有增加的趋势,软腐病发生逐年加重,春季大白菜软腐病病原菌是否与秋季一致也值得探讨。

本实验筛选出5个鉴别寄主,并将黑龙江省大白菜软腐病菌按照其在鉴别寄主上的抗感反应划分为5个致病力类型,并确定了黑龙江省各地区软腐病菌致病力类型的组成。说明本实验筛选的鉴别寄主是可靠的,有鉴别力的,能将大白菜软腐病菌划分为不同的致病力类型,为大白菜抗软腐病育种工作提供理论依据。

本次筛选的鉴别寄主是在较短时间内筛选出来的,考虑寄主的生态型及来源,每个抗性等级内只选1个大白菜品种为代表。许多品种虽同属于相同抗性等级,但抗性有一定差异,不同的鉴别寄主可将病

原菌划分为不同的致病力类型,实验需进一步验证。

黑龙江省大白菜软腐病菌可划分为5个致病力类型,在这5个致病力类型中,V型的比例最大,分布较广,在黑龙江省各地均存在,而且其致病力最强,说明黑龙江省大白菜软腐病优势致病菌也是致病力最强的菌株,这正是多年来软腐病经常发生的原因。随着抗病品种的推广,软腐病菌也随之分化,致病力逐渐增强。本实验所选用的抗病寄主‘秋绿60’,生产中表现优良,且抗病能力较强,但V型菌却能完全侵染,其原因可能是由于本实验采用离体接种,导致发病程度较重。黑龙江省大白菜软腐病菌致病力很强,目前生产上所用大白菜品种的抗性多数不如‘秋绿60’,如果遇到合适的条件,软腐病有大发生的可能,因此,加快培育抗软腐病的新品种既紧迫又有现实意义。

## 参考文献:

- [1] Ren J P, Dickson M H, Petzoldt R. Screening and identification of resistance to *Erwinia carotovora* in *Brassica rapa* crops [J]. *Cruciferae Newsletter*, 1995, 17(3): 86-87.
- [2] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998. 179-180.
- [3] Cuppels D, kelman A. Evaluation of selective media for isolation of soft rot bacteria from soil and plant tissue [J]. *Phytopathol*, 1974, 64(1): 468-475.
- [4] 崔崇士, 李柱刚, 张耀伟. 黑龙江省大白菜黑斑病菌致病型划分研究[J]. *北方园艺*, 2000, 25(1): 43-44.
- [5] 任欣正. 植物病原细菌的分类和鉴定[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994. 1-101.
- [6] 臧威, 崔崇士, 张耀伟. 大白菜软腐病苗期抗性鉴定方法的研究[J]. *北方园艺*, 2003, 28(3): 57-58.
- [7] 张光明, 王翠花. 大白菜抗软腐病接种鉴定方法的初步研究[J]. *山东农业科学*, 1995, 43(5): 39-40.
- [8] De Boer S H, Kelman A. Evaluation of procedures for detection of pectolytic *Erwinia* spp. on potato tubers[J]. *Am Potato J*, 1975, 52(1): 117-123.
- [9] Allan E, Kelman A. Immune of luerescent stain procedures for detection and identification of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* [J]. *Phytopathol*, 1977, 67(2): 1305-1312.
- [10] Cother E J, Powell V. Physiological and pathological characteristics of *Erwinia chrysanthemi* isolates from potato tubers [J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1983, 54(5): 37-43.
- [11] 王慧敏, 狄原渤, 王建辉. 北京地区蔬菜软腐细菌病原的研究[J]. *植物病理学报*, 1988, 18(1): 21-24.