

胡萝卜心腐病病原菌鉴定

Identification of the pathogen causing heart rot of carrot

郑雪玲 杨迪 孙静怡 王璐 王坦 黄思良*

(南阳师范学院农业工程学院, 河南 南阳 473061)

Zheng Xuelling Yang Di Sun Jingyi Wang Lu Wang Tan Huang Siliang*

(School of Agricultural Engineering, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, Henan Province, China)

胡萝卜富含多种维生素及胡萝卜素,在中国种植面积超40万 hm^2 。病害是影响胡萝卜储藏的重要因素。储藏期引起胡萝卜病害的病原微生物有真菌和细菌2类,分别以长喙壳菌 *Thielaviopsis* spp. (李婕等, 2014) 和欧文氏菌 *Erwinia* spp. (Farrar et al., 2000) 为主。2017年7月,本课题组在河南省南阳市市售胡萝卜中发现一种心腐病病害,该病害外观不显症而内部组织已腐烂,为确定该病病原菌,对该病样进行病原菌分离纯化和形态观察,在明确该病原菌致病性的基础上对其进行生理生化特性检测和分子生物学鉴定,以期为该病害的防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料:2017年7月在超市购买外观不显症而内部组织已腐烂胡萝卜和健康胡萝卜,品种为红森。

培养基:营养琼脂(nutrition agar, NA)培养基:蛋白胨10 g、琼脂18 g、牛肉膏3 g、NaCl 5 g、蒸馏水1 L;营养液(nutrition broth, NB)培养基:NA中不添加琼脂。

试剂及仪器:细菌基因组DNA提取试剂盒、Taq DNA聚合酶II,生工生物工程(上海)股份有限公司;其它试剂均为国产分析纯。Tgradient 96 PCR仪,华粤企业有限公司;HE33琼脂糖凝胶电泳系统,上海斯信生物科技有限公司;SYSTEM GelDoc XR+1708195凝胶成像仪,美国Bio-Rad公司;MJP-Y霉菌培养箱,上海精宏实验设备有限公司;SW-CJ-2FD洁净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;BM2100POL透反偏光显微镜,南京江南永新光学有限公司;BS-1E振荡培养箱,常州国华电器有限公司。

1.2 方法

病害症状观察:用灭菌解剖刀切开病样,对其进

行视觉和味觉检查,取约1~2 mm²病组织于无菌水中压片,在显微镜下观察是否有喷菌现象。

病原菌分离及形态观察:在洁净工作台上用75%酒精浸泡病样15 s,用0.1%升汞消毒3 min,无菌水冲洗5次,用灭菌解剖刀切开病样,取绿豆大的内部病组织于无菌水中捣烂,制成 1.6×10^4 CFU/mL细菌悬浮液,将细菌悬浮液稀释10倍后取50 μL 涂布于NA平板上,置于28℃霉菌培养箱中培养3 d,肉眼观察菌落形态,并随机选取2株单菌落细菌作为供试菌株,按常规细菌学方法对其进行菌体大小镜检、革兰氏染色反应和鞭毛着生情况观察。

供试菌株致病性测定:用灭菌接种环粘取供试菌株接种到NA平板上,于28℃霉菌培养箱中培养18~24 h后,备用。取1个健康胡萝卜,75%酒精表面消毒15 s,用灭菌解剖刀在近中部切边长为1 cm等边三角形、深度为1 cm的切口盖,将供试菌株接入其中,盖上切口盖,用洁净塑料袋包裹,以健康胡萝卜上开同样伤口、不接菌为对照,于30℃霉菌培养箱中培养7 d,观察胡萝卜发病情况。对接种的发病胡萝卜按上述方法再分离细菌,比较再分离菌与原接种菌的形态是否一致,按柯赫氏法则测定供试菌株的致病性。

供试菌株的鉴定:按常规细菌学方法分别对2株供试菌株的接触酶、甲基红、V-P、葡萄糖氧化、丙二酸盐利用、酯酶、20℃明胶水解、七叶灵、硫化氢、亚硝酸盐利用、硝酸盐还原、产荧光色素、脱氧核糖核酸酶、吡啶试验、糖发酵、氧化酶、淀粉水解、绿脓菌素试验、果胶酸盐利用、脲酶共20项生理生化特性进行检测。将供试菌株接种于含50 mL NB培养基的三角瓶中,在振荡培养箱中于25℃、180 r/min条件下培养24 h,在8 000 r/min下离心收集菌体,按照

细菌基因组DNA提取试剂盒说明书提取供试菌株基因组DNA,采用引物 *gyr*-320 (5'-TAARTTYGAY-GAYAACTCYTAYAAAGT-3') 和 *gyr*-1260 (5'-CMC-CY-TCCACCARGTAMAGTTC-3') 扩增 *gyrB* 基因序列,引物委托苏州泓迅生物科技股份有限公司合成。30 μ L PCR 扩增体系: ddH₂O 12 μ L、引物各 1 μ L、DNA 模板 1 μ L、*Taq* DNA 聚合酶II 15 μ L。PCR 扩增程序: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 40 s, 53℃退火 40 s, 72℃延伸 90 s, 32 个循环; 72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。序列经 DNAMAN 软件拼接后在 GenBank 中进行 BLAST 比对,采用邻接法应用 MEGA 4.0 软件构建系统发育树,重复 500。

2 结果与分析

2.1 胡萝卜心腐病害症状

发病初期胡萝卜外观症状不明显,后期颜色暗淡。病组织呈水渍状软腐或中空,无恶臭味,中部病害纵向扩展较快。胡萝卜发病组织遇水即释放大量的细菌,出现细菌性病害特有的喷菌现象。从病组织中分离获得菌落形态完全一致的细菌菌落,随机选取 2 个单菌落进行研究,分别命名为 H1 和 SP-2 菌株。

2.2 胡萝卜心腐病原菌的形态特征

在 NA 平板上 SP-2 菌株菌落呈乳白色,直径 3~4 mm,表面湿润光滑,隆起,边缘整齐,质地黏稠。H1 和 SP-2 菌株菌体均呈杆状,革兰氏阴性,具周生鞭毛。

2.3 胡萝卜心腐病原菌的致病性

接种后,胡萝卜肉质根自接种处均出现腐烂或中空,接种发病症状与自然发病症状相似,从接种发病组织再分离均获得了与原接种菌形态一致的细菌。根据柯赫氏法则证明 H1 和 SP-2 菌株为引起胡萝卜心腐病的病原菌。

2.4 胡萝卜心腐病原菌的鉴定

H1 和 SP-2 菌株的氧化酶、淀粉水解、绿脓菌素试验、果胶酸盐利用、脲酶均为阴性,其它项均为阳性,与普利茅斯沙雷氏菌 *Serratia plymuthica* 基本相符。H1 和 SP-2 菌株 *gyrB* 基因经 PCR 扩增后分别获得大小为 919 bp 和 914 bp 的片段。在系统发育树中,2 株病原菌与普利茅斯沙雷氏菌聚为一支,自举值为 100% (图 1)。BLAST 比对结果显示, H1 和 SP-2 菌株与普利茅斯沙雷氏菌的最大相似性大于 99%,故将其鉴定为普利茅斯沙雷氏菌。

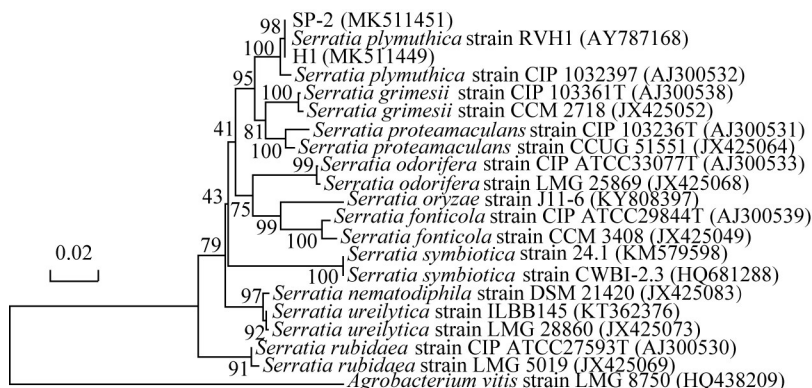


图 1 采用邻接法基于 *gyrB* 基因序列构建 H1 和 SP-2 菌株与相关种类的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of strains H1, SP-2 and related species constructed using neighbor-joining method based on *gyrB* sequences

3 讨论

从胡萝卜心腐病发病样品中分离获得病原菌菌株,按照柯赫法则明确了分离菌株对胡萝卜的致病性,并根据 *gyrB* 基因序列分析将其鉴定为普利茅斯沙雷氏菌。该菌引起胡萝卜心腐烂,但无恶臭,易与欧文氏杆菌胡萝卜亚种 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 引起的胡萝卜软腐病区分,后者有恶臭。普利茅斯沙雷氏菌常寄生于植物根际,菌株间有较大的遗传多样性(Kowalska et al., 2011)。除胡萝卜外,供试菌株对洋葱球茎、大白菜、萝卜和菜椒等部分采后蔬菜均有不同程度的致病力。

参考文献 (References)

- Farrar JJ, Nunez JJ, Davis RM. 2000. Influence of soil saturation on *Erwinia chrysanthemi* soft rot of carrot. *Plant Disease*, 84(6): 665-668
- Kowalska B, Smolińska U, Oskiera M. 2011. First report of *Serratia plymuthica* causing onion bulb rot in Poland. *Polish Journal of Microbiology*, 60(1): 85-87
- Li J, Sui W, Gao JM, Han YH, Li X, Li YC, Huang Q. 2014. Identification of the pathogen causing post harvest decay in carrot (*Daucus carota*). *Acta Phytopathologica Sinica*, 44(6): 705-708 (in Chinese) [李婕, 隋伟, 高锦梅, 韩永花, 李晓, 李永川, 黄琼. 2014. 采后胡萝卜腐烂病原菌鉴定. *植物病理学报*, 44(6): 705-708]

(责任编辑:张俊芳)