

吉林省大白菜腐烂的病原細菌种类鑑定

謝淑儀 白金鑑 潘順法 胡吉成

(吉林省农业科学院)

提 要

本文根据 82 个分离菌株的致病性和病原鑑定，結果表明，我省引致大白菜腐烂的病原菌主要是 *Erwinia aroideae* (Town.) Holland。而 *Erwinia carotovora* (Jones) Holland 較少。其它 *Erwinia* 屬 *Pseudomonas* 屬和 *Bacillus* 屬中的分离菌株致病力甚弱，不是引起田間病害流行的病原，其中某些菌株是引起貯藏期白菜腐烂的原因之一。

引 言

大白菜腐烂現象在我省每年都有不同程度的发生，不仅生长期在田間腐烂，而且在貯藏期烂窖現象也很严重。为了防治为害，首先必須了解其病原种类。此外，在調查发病为害情况或者观察某一品种的抗病性时，將凡是腐烂的白菜，都一律归咎于軟腐病或者为軟腐病的不同发生程度，用这样标准記載是不恰当的。只有明确使大白菜腐烂的不同症狀，发病程度与病原种类間的关系，才能得出正确的結論。为此，进行了引致大白菜腐烂的病原細菌种类鑑定。本文是报导这项工作的研究結果。

試驗材料和方法

試驗分为形态染色、培养性狀、生理生化反应、血清学反应和致病力的測定五个部分。

供試菌株系从1961年至1962年在田間烂白菜、窖藏烂白菜和不同白菜前槎土壤中分离82个細菌菌株。首先根据其致病性和培养性狀之不同加以初步归納，从中选择了有代表性的36个菌株作为試驗材料。

細菌的形狀大小，是經過在牛肉汁洋菜培养基上培养 24 小时后，用齐尔 (Ziehl) 复紅染色后观察的。格蘭氏染色是用胡凱 (Hucker) 的方法。荚膜用安东尼 (Anthony) 的染色法。孢子用 Moller 氏染色法。抗酸性用 Zieh—Neelun 氏染色法。鞭毛用下列方法染色：

染液甲		染液乙	
硫酸鋁鉀飽和液	20毫升	硼酸鈉	10克
蒸餾水	20毫升	美蘭	0.1克
20%單宁酸	10毫升	蒸餾水	200毫升
復紅酒精飽和液	3毫升		
95%酒精	15毫升		

新鮮培養18—24小時的細菌懸浮液滴在玻片上，干后用染液甲染色3—5分鐘，用淨水沖洗，干后用染液乙染色1—2分鐘，洗淨后在油鏡上檢查。

培養性狀主要觀察細菌在Uschinsky, Fermi, Cohn和Koser培養液上是否生長。

生理生化反應測定方法：硝酸鹽還原試驗所用培養基成份是蛋白胨10克，食鹽5克，硝酸鉀1克，蒸餾水1000毫升。病菌在培養基上培養五天后加一滴濃硫酸后再加碘化鉀淀粉試劑5滴，呈藍色即表示硝酸鹽還原成亞硝酸鹽。氨和硫化氫的產生均用蛋白胨培養基（蛋白胨5克、水1000毫升）；氨的測定用涅斯勒(Nessler)試劑。硫化氫的產生用經過飽和醋酸鉛浸過的濾紙測定。吡嗪產生用的培養基是蛋白胨20克， Na_2HPO_4 2克，葡萄糖1克，蒸餾水1000毫升，用Kovacs的方法測定。淀粉水解採用牛肉汁洋菜淀粉培養基（牛肉浸膏3克，蛋白胨10克、洋菜17克、可溶性淀粉2克、蒸餾水100毫升），在平面劃綫培養，用魯戈(Lugol)氏碘液測定。明膠的液化在明膠培養基（牛肉汁蛋白胨培養液中加入12%明膠）進行穿刺方法測定之。醣和其它碳素化合物的醱酵用磷酸銨組合培養基（磷酸二氫銨10克，氯化鉀0.2克，硫酸鎂0.2克，蒸餾水1000毫升），1%的醣或其他碳素化合物是分別加熱滅菌，在無菌的條件下加入，每升培養液中加入溴百里（香）藍指示劑的1.6%酒精溶液1毫升測定酸的產生。測定氣體的发生則用杜蘭(Durham)醱酵管。甲基紅和V—P試驗都按照標準的方法進行。分解脂肪能力的測定用的培養基成份是蛋白胨10克，酵母浸膏5克，25%棉籽油乳劑25毫升，0.3%乙醇夜蘭50毫升，洋菜20克，蒸餾水1000毫升。

血清學的反應，選擇了致病力較強的14個菌株，進行了各菌株的血清學特性比較和鑑定大白菜軟腐病菌的應用研究。用作注射抗原或測定抗原的細菌都是在牛肉汁、洋菜培養基中培養24小時，用0.85%生理食鹽水稀釋的。注射抗原是用活細菌的懸浮液，每隔四天注射一次，每次一毫升，共注射五次，各次濃度每毫升依次為1億、2億、4億、10億和20億個細菌。于最後一次注射后五天取血，共取兩次。后按常法進行試管交互凝集反應和玻片凝集試驗。

致病力的測定系分期採用不同方法進行室內外接種試驗。室內試驗系將培養在馬鈴薯、蔗糖、洋菜培養基上24小時的稀釋菌液，滴于保溫培養皿中消毒打孔的白菜幫的孔眼上，后置于28℃溫箱內培養24—48小時后調查其腐爛情況。田間接種試驗系用培養24小時的細菌懸浮液注射于田間生長的結球白菜的第二層菜幫上。

試驗結果

（一）病原鑑定

I. 病菌的形態染色、培養性狀和生理生化反應試驗。

根据36个菌株的形态染色，培养性状和生化反应结果（见表1），这些病菌分属于 *Erwinia*、*Pseudomonas* 和 *Bacillus* 三个属。属于 *Erwinia* 属的有：2、3、9、11、13、14、15、17、23、25、26、29、31、35、36和37号菌株。其中2、23、25、26、29、35号菌株是 *E. aroideae*，36和37号菌株是 *E. carotovora*。属于 *Pseudomonas* 属的有：1、4、5、6、7、10、12、16、18、21、22、24、27、28、30、32、33号菌株。但尚未发现能使植物组织软化腐败的 *Pseudomonas* 属的已知菌种。属于 *Bacillus* 属的有8、19和20号菌株，其中8号与 *Bacillus Subtilis* 相似。

II. 病菌的血清学特性及其玻片凝集反应的应用

根据36个菌株的生理生化反应结果，选出14个有代表性的菌株制备抗血清，用试管交互凝集反应法，观察各菌株间的血清亲缘关系，用玻片凝集反应法，了解鉴定 *Er. aroideae* 的可能性。

试管交互反应试验，其抗血清的稀释倍数从1:40开始，在37°C 温度下经两小时观察其反应结果如表2。

表2 血清试管交互反应结果

反应抗原 菌株代号	注射抗原所得抗血清的代号													
	2	6	8	10	11	12	16	17	24	28	29	30	35	36
2	256	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	64
6	0	512— 1024	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	4—32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	512	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	512	0	0	256— 2048	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	128	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	256— 512	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	2—128	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	256	0	128	64
24	0	0	0	0	0	0	0	0	8—128	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	128	0	128	64
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	128	0	128	64
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1024— 2048	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	64	0	128	256
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	512	0	0
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	64	0	128	32
36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	512
37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1024

注：1. 表内数字为形成阳性反应的抗血清效能。

2. 0 表示不起反应。

玻片凝聚反应，是将血清稀释4倍，在室温下经1—3分钟，观察其凝聚片的形成。试验结果如表3。

表 3

血清玻片凝聚反应结果

反应抗原 菌株代号	注射抗原所得抗血清的代号													
	2	6	8	10	11	12	16	17	24	28	29	30	35	36
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	3-4+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	±
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	3-4+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2+	-
8	-	-	3-4+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
10	-	-	-	3-4+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	4+	-	-	-	1-2+	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	4+	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	2-3+	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	1-2+	-	±-+	±	-	1-2+
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	1-2+	-	-	4+	-	4+	4+
24	-	-	-	-	-	-	-	-	4+	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	4+	-	4+	4+
26	-	-	-	-	-	-	-	±-+	-	-	4+	-	4+	4+
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4+	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4+	-	4+	4+
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1-2+	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4+	-	4+	4+
36	+	-	-	-	-	-	-	2+	-	-	1-2+	-	2-3+	4+
37	-	-	-	-	-	-	-	2+	-	-	2-3+	-	0-+	3-4+

注: +—4+ 示凝集片形成的不同程度。

参阅植物病理学报六卷二期120页。

试管交互凝集反应的试验结果表明, *E. arordeae* 的29号和35号菌株抗血清, 只与同一菌种的23、25、26、29(35)号菌株呈阳性反应, 对其它各菌株不起反应。 *E. carotovora* 的36号菌株抗血清除与同一菌种的37号菌株起阳性反应而外, 对 *E. aroi-*

deae 的 2、23、25、26、29、35 号菌株也起反应。E. aroideae 和 E. carotovora 的抗血清对 Erwinia 屬的其它菌株、Pseudomonas 屬及 Bacillus 屬的各菌株皆不起反应。初步証明 E. aroideae 的抗血清具有一定的專化性。

能与 E. aroideae (35 号菌株) 抗血清形成玻片凝集反应 (4+) 的菌株只有 E. aroideae 同种的 23、25、26、29 号菌株。相同的結果能与 E. aroideae (29 号菌株) 抗血清形成“4+”反应程度的也只有其同一菌种的 23、25、26 和 35 号菌株。E. aroideae 2 号菌株的抗血清只对本身起“4+”反应。

E. carotovora 36 号菌株的抗血清除对本身和同种的 37 号菌株起反应达“4+”而外，另对 E. aroideae 的 23、25、26、29 和 35 号菌株的反应程度也可达“4+”。

E. aroideae 和 E. carotovora 病原細菌对其它 Erwinia 屬，Pseudomonas 屬和 Bacillus 屬的各菌株的抗血清不起反应或者呈极微的反应程度。反之，E. aroideae 和 E. carotovora 的抗血清对 Erwinia 屬，Pseudomonas 屬和 Bacillus 屬的各菌株的細菌也不起反应，或者呈不甚明显的反应程度。

本試驗通过 36 个在本地区常見菌株的試驗結果表明，用玻片凝集法初步鑑定 E. aroideae 是可能的，但用 E. carotovora 的抗血清区别出 E. aroideae 有困难，因为它的反应程度也可达“4+”。反之，用 E. aroideae 的抗血清，根据其凝集片的形成大小与速度，鑑別 E. carotovora 还有一定参考价值。

由于玻片凝集反应，抗原和抗体必須在較短的 1 分鐘左右時間完成凝集結合之后，才能出現可見的凝集片，这样必須要抗原与抗体的亲緣关系一致或者非常相近似，否則是不可能呈現“4+”反应。这个特点也反应在我們這項試驗結果之中，故初步認為利用玻片凝集反应法，做为初选手段鑑定我省大白菜軟腐病的主要病原 E. aroideae 是有可能的。

(二) 各菌株致病性及其腐爛症狀的鑑定

1962 年用白菜幫接种法測定 36 个菌种的致病性，并观察各菌种致病后的腐爛症狀，結果如表 4。

表 4 各菌株致病性測定及其发病症狀

細菌菌株代号	引致白菜腐爛的症狀
2, 8, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 35, 32, 33, 36, 37	山鷄黃或菊蕾白色腐爛，透明，臭味。
1, 11, 17, 19, 30	山鷄褐色腐爛
3, 12	近藥黃色局部腐爛
4, 7	淡蜜黃色局部腐爛
5, 10, 15, 22	茉莉黃色局部腐爛
6, 16, 18	炒米黃色局部腐爛
9	山鷄黃色局部腐爛
14, 21, 28	砂石黃色局部腐爛
20	桂皮淡棕色局部腐爛
31	山鷄褐色局部腐爛

E. aroideae 引致白菜幫腐爛的症狀是：山鷄黃或菊蕾白色腐爛并透明有臭味。可引致相類似的症狀菌株有：屬於 E. aroideae 的 2、23、25、26、29 号菌株；屬於 E.

carotovora 的36和37号菌株；属于 *Bacillus Subtilis* 的8号菌株和 *Pseudomonas* 属的24、27、32、33号菌株。此外，从白菜帮的腐烂程度来看与 *E. aroideae* 相似，但病症颜色是山鸡褐色者有：11和17号菌株；*Pseudomonas* 属1号和30号菌株；*Bacillus* 属的19号菌株。其它只能引致白菜帮的局部腐烂。

1963年在温室和田间将上述致病力较强的1、2、8、11、12、13、17、19、23、24、25、26、28、29、30、32、33、35、36和37号菌株进行侵染力的鉴定，接种在包心期以后的大棵白菜品种，每菌株接种3—5株重复一次。

其鉴定结果表明，能引致大白菜全身性腐烂的，其病症颜色为山鸡黄，透明有臭味者只有 *E. aroideae* 的2、23、25、26、29和35号菌株。*E. carotovora* 的36号和37号菌株的致病力减弱。其它菌株只能使接种的部分白菜帮腐烂。这种症状，在田间发生不应记载为大白菜软腐病或者是软腐病的不同发生程度，因为它是由寄生力很弱的不同细菌造成的，这类细菌在大白菜生长后期特别是贮藏期有的可使白菜帮腐烂，是贮藏期造成烂白菜原因之一，但不是田间软腐病大发生的病原。

根据这项试验结果表明，在吉林省引致白菜腐烂致病力最强的细菌主要是 *E. aroideae*，*E. carotovora* 次之，其它只能引致个别的白菜帮腐烂，而不象 *E. aroideae* 那样迅速的使大白菜周身完全腐烂。可见本地区造成大白菜腐烂的流行性病原细菌的种类比较单纯。

讨论和结论

L. R. Jones 1902年第一次将软腐性的细菌定名为 *Bacillus (Erwinia) carotovorus*。1907年 C. O. Townsend 从 *Calla lily* 上分离出一种软腐细菌并定名为 *Bacillus (Erwinia) aroideae*。在同一时期内又有人在不同地区或不同寄主植物上将分离到的软腐细菌分别定名为 *B. atrosepticus*，*B. oleraceae* 和 *B. omnivorum* 等等。到1909年 H. A. Harding 和 W. J. Morse 对软腐细菌用43个菌株做了第一次比较研究，根据在醱类中的发酵情况，将只生酸而不生气体的 *B. aroideae* 等分为一群，生酸而产生气体的 *B. carotovorus* 等为一群。同时，该两氏认为 *B. aroideae* 和 *B. carotovorus* 应区分为两个种。这个建议被后来的研究者所接受。

在我国，1933年黄亮在南京从黄芽菜、甘蓝和胡萝卜上分离到 *Erwinia aroideae* (Town.)Holland 和 *Erwinia carotovora* (Jones) Holland。裘维蕃等在华北自1949年以来从白菜上所分离出来的致病细菌，极大部分属于 *E. aroideae* 类型，而从甘蓝、胡萝卜上的软腐病患处所分离出来的极大部分属于 *E. carotovora* 类型，经交互接种证明 *E. carotovora* 也能侵染北京大白菜。

我们根据82个分离菌株的鉴定结果表明，引致大白菜腐烂的主要细菌是 *E. aroideae*，大白菜感病后形成典型的软腐病症状。*E. caroideae* 仅在贮藏期的腐烂白菜帮上分离到，且致病力不如 *E. aroideae* 强并逐渐消失。在分离到的 *Erwinia* 属中的另外一些菌株，对大白菜侵染力甚弱，只能造成局部或个别菜帮腐烂，不是引致大白菜腐烂的要病原细菌。

属于 *Pseudomonas* 属的共鉴定17个菌株，但尚没有发现能使植物组织软化腐败的

*Pseudomonas*屬中的*P. aeruginosa*, *P. alliicola*, *P. cepacia*, *P. cichorii*, *P. fluorescens*, *P. gladioli*, *p. intybi*, *P. marginalis*, *P. solanacearum*, *P. syringae*, *P. viridilivida*及*P. xanthochlora*。

屬於*Bacillus*屬的有8、19和20號菌株，其中8號菌株與*Bacillus subtilis*相似。在自然界中分布較為普遍的引起植物腐敗的 *Bacillus polymyxa* 細菌，在我們的試驗中還沒有發現過。

*E. aroideae*和*E. carotovora*，侵染大白菜的發病症狀是山鷄黃或菊蕾白色，腐爛、有臭味，在適宜條件下2—3天內可使大白菜全身軟腐，前者是我省的主要大白菜軟腐病的病原細菌。*Bacillus subtilis* (8號菌株)和*Pseudomonae*屬的24、27、32、33號菌株也可使白菜形成山鷄黃或菊蕾白色腐爛，有臭味，但通過田間人工接種證明，只是局部腐爛，不像*E. aroideae*那樣迅速的使大白菜全身腐爛。*Erwinia*屬的11號和17號菌株、*Pseudomonae*屬的1號30號菌株及*Bacillus*屬的19號菌株，侵染大白菜時只呈局部性的山鷄褐色腐爛。這些菌株可能是貯藏期的白菜腐爛原因之一。

調查大白菜軟腐病的發病情況時，應根據病症狀及病症顏色之差異而記載，不應把不同程度的腐爛白菜都歸咎於*E. aroideae*引起的或者是軟腐病的不同發病等級。

可以用血清玻片凝集反應法做為初步鑑定*E. aroideae*的手段。

主要參考文獻

- 〔1〕黃亮：1933，蔬菜軟腐病之防除，農林新報 10：254—258。
- 〔2〕裘維善：1955 關於白菜軟腐病調查研究的經過及展望，科學通報 6期 39—40。