

魔芋软腐病菌的致病条件及致病因子

何峰^{1,2} 杨英^{1,2} 张伟^{1,2} 季家兴^{1,2} 王雪迪^{1,2} 余龙江^{1,2*}

(1. 华中科技大学分子生物物理教育部重点实验室 湖北 武汉 430074)

(2. 华中科技大学生命科学与技术学院资源生物学与生物技术研究所 湖北 武汉 430074)

摘要: 本文研究了魔芋软腐病菌欧文氏杆菌的致病条件以及致病过程中起重要作用的因子。结果表明, 该病原菌侵染魔芋的最适温度范围为 25°C–30°C, 湿度范围为 90%–95%。当魔芋受病菌侵染后, 从魔芋病斑处和病健处都能检测到果胶酶和纤维素酶, 随着腐烂程度的升高酶活迅速升高, 果胶酶酶活第 6 天达到最高值 1.2473 U/mg, 纤维素酶酶活在第 9 天达到最高值 1.0813 U/mg。表明纤维素酶和果胶酶在魔芋软腐病菌致病过程中起重要作用。

关键词: 魔芋软腐病, 欧文氏杆菌, 致病条件, 纤维素酶, 果胶酶

Infection Conditions and Factors of Konjac's Soft-rot *Erwinia* Bacterium

HE Feng^{1,2} YANG Ying^{1,2} ZHANG Wei^{1,2} JI Jia-Xing^{1,2} WANG Xue-Di^{1,2}
YU Long-Jiang^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Molecular Biophysics, Ministry of Education, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China)

(2. Institute of Resource Biology and Biotechnology, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China)

Abstract: *Amorphophallus konjac*, rich in konjac glucomannan and many other active components, has been used widely in food, medicine and biochemical field. However, konjac diseases caused by *Erwinia* bacterium become more and more serious, which is a devastating catastrophe to konjac production. Therefore, it is necessary to study the pathogenesis of konjac's soft rot disease. In the present study, it mainly focused on the infection conditions and factors of the *Erwinia* bacterium. The main results showed that the appropriate temperature and humidity for infection was 25°C–30°C and 90%–95%, respectively. When the konjac was badly decomposed, the activities of cell wall-degrading enzymes including pectinase and cellulase increased rapidly, which reached the maximum value of 1.2473 U/mg on the 6 days and 1.0813 U/mg on the 9 days, respectively. The results indicated that the pectinase and cellulase were both important during the infection.

Keywords: Konjac's Soft Rot Disease, *Erwinia* bacterium, Infection conditions, Cellulase, Pectinase

魔芋(*Amorphophallus konjac*)为天南星科多年生草本植物, 其主要成分魔芋葡甘聚糖是最好的膳

食纤维之一, 有“清道夫”之美誉。魔芋产业孕育着无限商机, 然而魔芋病害日趋严重, 特别是魔芋软腐

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2007BAD73B01, 2007BAD73B02)

* 通讯作者: Tel: 86-27-87792265; E-mail: yulongjiang@hust.edu.cn

收稿日期: 2010-01-22; 接受日期: 2010-03-01

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

病,对魔芋产业带来毁灭性灾难。魔芋软腐病是由胡萝卜软腐欧文氏杆菌(*Erwinia bacterium*)引起的细菌性病害^[1-2],该病菌可侵害魔芋芽、小叶、叶柄、块茎等各个部位,还可引起储藏期魔芋块茎腐烂、变软并发出酒臭味,从患病处流出的带菌汁液又重新侵染新的植株,使之发病,导致成片倒苗。目前有关魔芋软腐病的研究主要集中在如何有效防治魔芋软腐病大规模爆发方面,而有关其致病机理方面的研究报道较少。因此,本文主要研究魔芋软腐病菌的致病条件,并探索病原菌致病过程中起重要作用的因素,为进一步有效防治魔芋软腐病的发生奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

欧文氏杆菌,由华中科技大学生命科学与技术学院从恩施土家族苗族自治州农业科学院采集的带病魔芋上分离纯化、鉴定和保藏;魔芋种芋,由恩施土家族苗族自治州农业科学院提供。

主要试剂:5 mg/mL 羧甲基纤维素钠(国药集团安泰公司,精确称取0.5 g 羧甲基纤维素钠,加入适量0.05 mol/L pH 5.0的柠檬酸缓冲液定容至100 mL,4℃保存备用);果胶(Sigma 公司,制备方法同上);0.05 mol/L pH 5.0的柠檬酸缓冲液(20.5 mL 0.1 mol/L 柠檬酸溶液,29.5 mL 0.1 mol/L 柠檬酸三钠溶液定容至100 mL);DNS显色剂;pH 7.4 Tris-HCl缓冲液。

主要仪器:温控摇床(汇城科技有限公司);RXZ型智能人工气候箱(宁波东南仪器有限公司);超净工作台(苏净集团安泰公司);METTLER AE100 电子分析天平;可见分光光度计(UNICO 尤尼柯上海仪器有限公司);BS60 型电热三用水箱(北京医疗设备厂);CENTRIFUGE TDL-5 离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 温度对病原菌侵染魔芋的影响:将健康魔芋球茎表面进行彻底消毒后,置于保湿的无菌培养皿中。用消毒针将各球茎刺成微小伤口,向伤口喷洒培养好的病菌悬浮液(浓度为 1×10^8 个/mL),以无菌水为对照,每个实验取30个魔芋。将处理后的魔芋及其对照分别置于15℃–40℃人工气候箱中,持续跟踪观察其发病情况,统计发病率^[3-5]。

1.2.2 湿度对病原菌侵染魔芋的影响:将健康魔芋球茎表面进行彻底消毒后,置于保湿的无菌培养皿中。用消毒针将各球茎刺成微小伤口,向伤口喷洒培养好的病菌悬浮液(浓度为 1×10^8 个/mL),以无菌水为对照,每个实验取30个魔芋。将处理后的魔芋及其对照分别置于不同湿度60%–95%的人工气候箱中,培养温度为30℃。持续跟踪观察其发病情况,统计发病率。

1.2.3 魔芋软腐病的致病因子研究:(1)带病魔芋中纤维素酶和果胶酶活性测定:分别从带病魔芋的病斑处、魔芋的染病处与健康处的交界地方(即病健处)、魔芋健康处切取0.2 cm²的魔芋组织块,各称取1 g 组织块(鲜重),分别置于5 mL 浓度为1 mol/L NaCl 提取液中(20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,pH 值7.4),在4℃研磨、过滤、离心(8000 r/min),取上清液,测定上清液中纤维素酶和果胶酶的活性^[6-8]。纤维素酶的1个酶活单位定义为1 h 催化底物产生1 mg 葡萄糖所需的酶量。果胶酶的1个酶活单位定义为1 h 催化底物产生1 mg 半乳糖醛酸所需的酶量。(2)魔芋软腐病菌纤维素酶和果胶酶活性的测定:制备LB培养基,pH 6.5,1 × 10⁵ Pa 灭菌30 min,冷却后接入欧文氏杆菌液3 mL (浓度为 1×10^6 个/mL),置于旋转式摇床振荡培养48 h,转速120 r/min,培养温度30℃,培养结束后,收集菌体,置于4℃下10000 r/min 离心10 min,上清液即为粗酶液,按照上述方法测定其纤维素酶和果胶酶的活性。(3)人工接种软腐病菌的魔芋中纤维素酶和果胶酶活性的测定:按照上述的针刺法在健康魔芋中接种软腐病原菌悬浮液(浓度为 1×10^8 个/mL),然后将接种病原菌的魔芋置于30℃,湿度为90%的人工气候箱中培养,按照上述方法检测魔芋病斑处纤维素酶和果胶酶活性的动态变化。

2 结果

2.1 病原菌侵染条件的研究

2.1.1 温度对病原菌侵入的影响:病原菌的侵入会导致魔芋腐烂,通过统计腐烂魔芋的数量可以判断病原菌的侵入能力高低。从表1中可以看出,不同温度下魔芋腐烂的数量不同,即温度对病原菌的侵入能力有较大影响。当温度较低时,魔芋腐烂个数较少,发病率也较低;当温度升高时,魔芋腐烂个

数增多,发病率也升高;当温度为 30℃ 时,发病率高达 93.33%;当温度进一步升高时,魔芋腐烂个数减少,发病率也降低。这可能是因为,合适的温度有利于魔芋软腐病菌的生长和繁殖,其侵入能力也增强;而温度偏高时,不利于魔芋软腐病菌的生长和繁殖,甚至会导致魔芋软腐病菌的死亡,其侵入能力也随之减弱。

2.1.2 湿度对病原菌入侵的影响:从图 1 可以看出,湿度的变化对病原菌的侵入也影响较大。当湿度保持在 60%时,发病率仅为 21.5%;随着湿度的升高,发病率也升高;湿度达到 95%时,发病率高达 97.5%。这可能是因为较高的湿度有利于魔芋软腐病菌的生长、繁殖。

2.2 魔芋软腐病的致病因子的研究

由于魔芋感染软腐病菌后,球茎软化,组织腐烂成粘稠糊状,有大量菌液溢出,散发出酒臭味,最后变成黑色干腐状的海绵状物,地上部分植株基

部倒伏软腐。根据这些现象和前期预实验的结果,我们选取纤维素酶和果胶酶作为研究对象,探讨魔芋软腐病的致病因子。

2.2.1 带病魔芋中纤维素酶和果胶酶活性测定:带病魔芋病斑处、病健交界处和健处纤维素酶和果胶酶活存在明显的差异(如表 2 所示)。在魔芋健处,纤维素酶活非常低,其果胶酶活为 0.2611 U/mg,大于纤维素酶活性。在魔芋病健交界处,两种酶活均很高,分别达到 0.8984 U/mg 和 0.8364 U/mg。而在魔芋的病斑处,纤维素酶活为 0.4994 U/mg,其果胶酶的活性大于纤维素酶的活性,达到 0.9146 U/mg。这说明在感染初期(病健交界),纤维素酶和果胶酶的活性都快速增加,到了感染后期(病处)果胶酶的活性仍在增加,而纤维素酶的活性却降低了很多。值得注意的是,在魔芋病斑处的酶活和病健处的酶活都较高,只有健处稍低。这说明魔芋软腐病菌从开始感染到爆发的整个致病过程中,这 2 种酶可能都具有重要的作用。

表 1 温度对病原菌入侵的影响
Table 1 Effects of temperature on the infection of the pathogen

温度(°C) Temperature (°C)	腐烂个数 Number of rot Konjac	发病率(%) Morbidity (%)
15	2	6.67
20	12	40.0
25	23	76.7
30	28	93.3
35	15	50.0
40	7	23.3

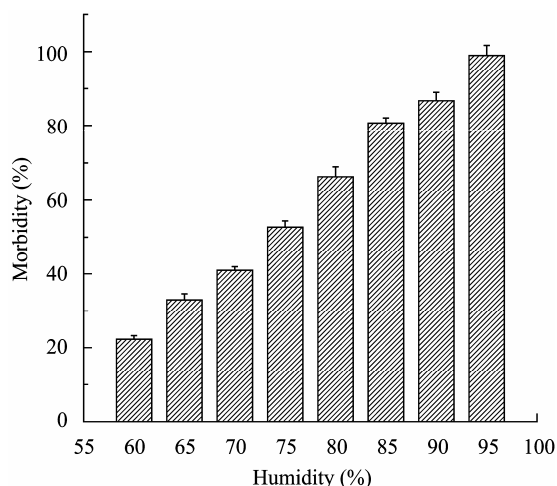


图1 湿度对病原菌入侵的影响

Fig. 1 Effects of humidity on the infection of the pathogen

表 2 带病魔芋纤维素酶和果胶酶的活性比较
Table 2 Comparison of the activities of pectinase and cellulase in sick konjac

部位 Place	纤维素酶(U/mg) Pectinase activity (U/mg)	果胶酶(U/mg) Cellulase activity (U/mg)
健处 Healthy tissues	0.0253 ± 0.005	0.2611 ± 0.011
病健交界处 Interface of diseased and healthy tissues	0.8984 ± 0.023	0.8364 ± 0.036
病处 Diseased tissues	0.4994 ± 0.016	0.9146 ± 0.028

2.2.2 魔芋软腐病菌中纤维素酶和果胶酶活性的测定:魔芋软腐病菌中纤维素酶和果胶酶活性的测定结果如表 3 所示。在不同温度下均能产生果胶酶,但其酶活相差较大。在 20℃ 时,果胶酶的活性较低,随着温度升高,在 30℃ 时,果胶酶活性达到最大,为 0.2922 U/mg,当温度进一步升高时,其活性开始下降。对于纤维素酶,在各种温度下,其酶活均较低,当温度为 30℃ 时,其酶活也有所上升,达到 0.0405 U/mg。与带病魔芋中纤维素酶和果胶酶的活性相比,体外这两种酶的活性明显偏低,这可能是因为魔芋软腐病菌在体外无需产生这两种酶,就可以获得足够的营养以保证其生长繁殖。

2.2.3 人工接种软腐病菌的魔芋中纤维素酶和果胶酶活性的动态变化: 魔芋病处酶活变化如图 2 所示, 被致病菌侵染后, 随着魔芋腐烂程度的加剧, 魔芋病处两种酶活都迅速升高, 而且果胶酶活性增加速度高于纤维素酶。在接种病原菌后第 6 天, 果胶酶酶活达到最高, 为 1.2473 U/mg, 但随后几天, 随着魔芋进一步腐烂, 果胶酶的活性开始降低。在接种病原菌后第 9 天, 纤维素酶酶活达到最高, 为 1.0813 U/mg。随后, 纤维素酶活开始降低, 且其酶活降低速率明显快于果胶酶酶活。

表 3 魔芋软腐病菌中纤维素酶和果胶酶的活性 Table 3 The activities of pectinase and cellulase of <i>Erwinia</i> bacterium cultured at different temperature		
培养温度(°C) Temperature (°C)	纤维素酶(U/mg) Pectinase activity (U/mg)	果胶酶(U/mg) Cellulase activity (U/mg)
20	0.02305 ± 0.003	0.1278 ± 0.018
25	0.02617 ± 0.002	0.2493 ± 0.022
30	0.0405 ± 0.006	0.2922 ± 0.011
37	0.0225 ± 0.001	0.2679 ± 0.015
40	0.0125 ± 0.002	0.0890 ± 0.003

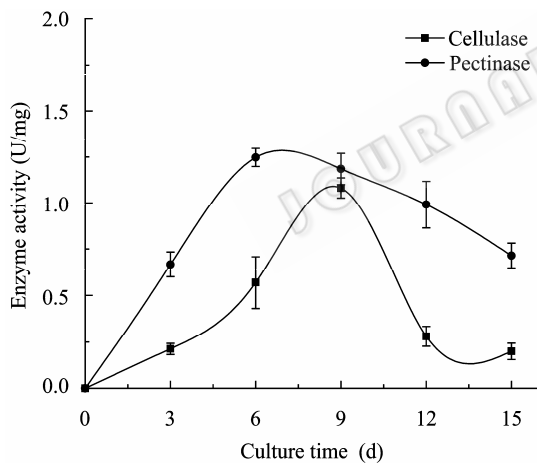


图 2 病处酶活动态变化
Fig. 2 Dynamic changes of enzyme activity in infected part of the konjac

3 讨论

魔芋软腐病是由欧文氏杆菌所致, 其病原菌不仅致病性强, 且条件适宜时潜育期短。研究表明, 该菌最适侵染魔芋的温度范围 25°C–30°C, 湿度为 90%–95%, 同一温度下湿度越大, 魔芋的发病率

越高, 说明该病菌的入侵至魔芋发病均需较高的温度和湿度。夏季的高温高湿条件为病原菌的入侵提供了良好的环境, 因此导致魔芋软腐病的大规模爆发。

在魔芋软腐病菌的致病过程中, 从病处、病健处以及健处都能检测到果胶酶, 而纤维素酶也能从病处、病健处检测到, 这说明纤维素酶、果胶酶可能是重要的致病因子。在病原菌中, 两种酶活性均较低, 但魔芋被病原菌入侵后, 魔芋体内这两种酶活迅速升高, 这表明在病原菌入侵魔芋过程中, 这两种酶可能被诱导大量合成。此外, 因为从健处也能检测到果胶酶, 在病原菌入侵魔芋过程中, 其果胶酶活性快速增加, 并且远远高于纤维素酶的活性, 因此推测, 在魔芋染病过程中, 首先起作用的可能是果胶酶, 它能引起植株中果胶质的分解, 然后由纤维素酶降解植株纤维质, 最后引起魔芋植株的腐烂、死亡。

参考文献

[1] Hoyashi N. The seed corm transmission of konnykus (*Amorphophallus konjac*) soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* Gunma. *Journal of Agricultural Research*, 1988(5): 25–34.

[2] 沈业寿, 储苏. 魔芋软腐病病菌的分离及致病性研究. *安徽大学学报*, 2002, 26(1): 96–99.

[3] 修建华, 姬广海, 王敏, 等. 魔芋软腐病菌分子鉴定与遗传多样性. *微生物学报*, 2006, 46(4): 522–525.

[4] 陆宁海, 徐瑞富, 吴利明, 等. 番茄褐斑病菌的侵染条件及致病性研究. *西北农林科技大学学报*, 2005, 8(33): 91–94.

[5] 徐秉良. 苹果链格孢菌侵染条件及致病性研究. *甘肃农业大学学报*, 1997, 32(1): 43–46.

[6] 陆宁海, 吴利明, 田雪亮, 等. 黄瓜褐斑病菌侵染条件及致病性研究. *湖北农业科学*, 2006, 34(10): 2186–2187.

[7] 傅力, 丁友. 纤维素酶测定方法的研究. *新疆农业大学学报*, 2000, 23(2): 45–48.

[8] 王琳, 刘国生, 王林嵩, 等. DNS 法测定纤维素酶活力最适条件研究. *河南师范大学学报*, 1998, 26(3): 65–69.

[9] 孙越. 果胶酶活性的测定方法. *食品科技*, 1997(3): 37–38.