西北农业学报 2018,27(1):76-83
Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica doi: 10.7606/j.issn.1004-1389.2018.01.011

网络出版日期:2018-01-12
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20180112.0934.022.html

青海省马铃薯软腐病病原菌的鉴定

王 信[1,2],程 亮[2,3],蔡晓剑[1,2],王亚艺[1,2],高旭升[1,2],李松龄[1,2]

(1.青海大学 农林科学院 土壤肥料研究所,西宁 810016;2.青海大学 省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室,西宁 810016;3.青海大学 农林科学院 植物保护研究所,西宁 810016)

摘 要 为明确引发青海省马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)软腐病的病原菌,通过对病原菌形态、生理生化特性、16S rRNA 基因序列以及胡萝卜果胶杆菌胡萝卜亚种(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)的 pECC2F 序列特征分析,对青海省 5 个地区马铃薯软腐病病样的病原菌进行病原学鉴定。结果表明,分离的 5 个菌株均能引发马铃薯软腐病,病原菌鉴定为胡萝卜果胶杆菌胡萝卜亚种。生理生化研究表明,该病原菌菌株均可在 37 ℃ 生长,能使明胶液化,具有耐盐性(50 g/L NaCl),对红霉素不敏感,过氧化氢酶反应显示为阳性,蔗糖试验还原反应、氧化酶、磷酸酶活性和吲哚产生试验显示均为阴性,可以利用柠檬酸盐、乳糖、纤维二糖、棉子糖和蜜二糖,但是不能利用 D-麦芽糖、山梨醇、D-阿拉伯糖醇和 α-甲基葡萄糖。接种马铃薯块茎致病力测定分析表明,亚种内不同地区的菌株间不存在致病力差异。

关键词 马铃薯;软腐病;致病性;病原鉴定;青海

中图分类号 Q939 **文献标志码** A **文章编号** 1004-1389(2018)01-0076-08

马铃薯是青海省的主要粮食作物,是结构调整中重点发展的十大产业之一,而且成为青海省农民增收的主要产业。2013 年青海省马铃薯种植面积达到 9.56 万 hm^2,总产量达到 2 150 万 t[1],仅次于小麦和油料,成为第三大作物,主要种植于互助、民和、乐都、湟中、大通、平安等东部各县的山区。马铃薯软腐病是青海马铃薯生产的主要病害之一,该病害初期仅在局部地区发生,随着带病种薯的频繁调运,种植面积逐年扩大,危害越来越大。因此,防治马铃薯软腐病是确保青海省马铃薯高产、稳产的重要环节,也是确保收获的块茎能够安全储藏的重要条件之一。果胶杆菌属(*Pectobacterium*)病原菌是造成马铃薯软腐病、茎枯萎和黑胫病以及其他寄主植物的致病菌,在作物生长、繁殖、运输和储藏期间都可造成危害,引起作物经济损失。果胶杆菌属系肠杆菌科的一员,和其他致病因子一样,分泌大量的植物细胞壁降解酶,引起植物组织浸渍和水浸症状,感染植物组织后通常表现为软腐[2-3]。果胶杆菌属依据其寄主范围、生理生化和分子特征,将其分为 5 个种,分别为软腐果胶杆菌胡萝卜亚种[*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) (syn. *Erwinia carotovorum* subsp. *carotovorum*)],黑腐果胶杆菌[*P. atrosepticum* (Pa) (syn. *E. carotovorum* subsp. *atrosepticum*)],山葵果胶杆菌[*P. wasabiae* (Pw) (syn. *E. carotovorum* subsp. *wasabiae*)],软腐果胶杆菌甜菜亚种[*P. betavasculorum* (Pbv) (syn. *E. carotovorum* subsp. *betavasculorum*)]和软腐果胶杆菌巴西亚种[*P. carotovorum* subsp. *brasiliense* (Pcb)][4]。果胶杆菌属寄主范围广泛,从土壤、水体、寄主植物和节肢动物上都可以分离获得此属的菌株。其中 Pa 通常在温带寄主植物上存活[5],而 Pcb 和 Pw 通常在热带和亚热带地区引起马铃薯软腐病和黑胫病[6]。目前为止,果胶杆菌属引起马铃薯软腐病在中国部分地区已有报道,然而青海地区马铃薯软腐病致病菌的致病性和分类鉴定鲜有报道。本研究从青海省的乐都县、互助县、湟中县、大通县和平安县马铃薯生产田的马铃薯软腐病的发病块茎组织中分离病原

收稿日期:2017-05-26 **修回日期**:2017-06-21
基金项目:青海省科技计划项目基础研究计划(2015-ZJ-705);青海大学中青年科研基金(2014-QNY-7,2015-QNY-2)。
第一作者:王 信,女,副研究员,从事植物病理学研究。E-mail:wangx710@163.com
通信作者:李松龄,男,研究员,主要从事土壤微生物研究。E-mail:465883114@qq.com

菌,通过对病原菌的形态观察、生理生化指标测定,分析马铃薯软腐病病原菌的致病性、表型特征和 16S rRNA 基因序列的系统发育树,明确青海省马铃薯细菌性软腐病的病原菌种类及其生物学特征和致病力差异。

1　材料与方法

1.1　病样采集及培养基

马铃薯软腐病标样采集于青海省的乐都县、互助县、湟中县、大通县和平安县的马铃薯生产田。

结晶紫果胶酸盐选择性培养基(CVP):在 500 mL 沸腾的蒸馏水中按顺序加入 1 mL 0.75 g/L 结晶紫溶液,4.5 mL 1 mol/L NaOH 溶液,3 mL 100 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 溶液(新鲜溶液),3.0 g 琼脂粉,1.0 g $NaNO_3$,9.0 g 聚果胶酸钠,在聚果胶酸钠加入时人工搅拌 30 s,然后分别装入三角瓶,121 ℃灭菌 20 min,趁热将培养基倒入无菌培养皿中,冷却后制成平板。

Luria-Bertani 培养基(LB):胰蛋白胨 10.0 g,酵母提取物 5.0 g,氯化钠 10.0 g,琼脂粉 15 g,用去离子水混合定容至 1 000 mL,pH 7.0。然后分别装入三角瓶,121 ℃灭菌 20 min,趁热将培养基倒入无菌培养皿,冷却后制成平板。

1.2　病原菌分离

采用常规组织分离法分离病原菌。称取 0.1 g 病块茎置于 250 mL 的三角瓶中,并加入 100 mL 的蒸馏水,放入玻璃珠充分打散混合液,置于 120 r/min 摇床中,培养 30 min 后,充分摇匀。用 1 mL 无菌的吸管吸取 10^{-2} mL^{-1}菌悬液 1 mL 放入 9 mL 的无菌水管中,吹吸 3 次混匀即为10^{-3} mL^{-1}稀释液,依次从 10^{-3} mL^{-1}连续稀释至10^{-7} mL^{-1},即得一系列 10 倍的稀释液。每个梯度重复进行 3 次平行试验,分别涂布到 CVP 培养基上,25～27 ℃黑暗培养 48 h,将形态典型的菌落在 CVP 培养基反复划线,进行纯化培养,挑取单菌落进行编号和保存。

1.3　致病力测定

选择健康马铃薯品种'大西洋'的块茎用于致病性分析。将 5 个待测菌株于液体 LB 培养基中培养 24 h,用无菌的 9 g/L 溶液洗涤 3 次后,配置 5×10^8 cfu/mL 的菌悬液。将无病的大小均匀的块茎用自来水冲洗后放入 5 g/L NaCl 溶液中洗 2 次,每次 20 min,然后用无菌去离子水冲洗 1～2 次,放入超净台中自然晾干,用无菌竹牙签给每个块茎打 2～3 个接种孔,深度约为 20 mm,用 9 g/L NaCl 溶液配制成 5×10^8 cfu/mL 的菌悬液,取 10 μL 加入接种孔中,每个菌株接种 10 个块茎。用凡士林将块茎上的接种孔封口保湿,将接种的块茎置于温度为 22 ℃、相对湿度≥92% 的温室培养。同等条件下,设无菌 9 g/L NaCl 溶液为空白对照。接种后 72 h 时测量病斑的直径并取其平均值作为病斑平均直径。按以下分级标准记录病斑:1～5 mm 为弱致病力,5～10 mm 为中等致病力,10 mm 以上为强致病力。

1.4　菌株形态和生物化学特性分析

菌落形态、革兰氏染色和鞭毛染色、柠檬酸盐分解及 37 ℃生长测定参照《植病研究方法》(第 3 版)[7]进行。病原菌对蔗糖、麦芽糖、山梨醇、阿拉伯醇、乳糖和 α-甲基葡糖苷等的利用测定试验参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 8 版)[8]和《植病研究方法》(第 3 版)[7]进行。选用青海大学农林科学院土壤肥料研究所农业微生物实验室(以后称本实验室)保存的软腐病致病菌 Pa(编号:Ba11)和 Pcc(编号:ECC71)为对照菌株。

1.5　16S rRNA 基因片段的扩增与序列分析

1.5.1　基因组 DNA 的提取　将保存于－80 ℃冰箱的菌株划线,并于 28 ℃培养箱中倒置培养过夜活化,挑取单菌落放入液体 LB 培养基中,置 28 ℃培养 16～18 h。病菌 DNA 的提取使用 Ezup 柱式 SK8255 试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]。取 1 μL DNA 溶液用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,DNA 于－20 ℃保存,备用。

1.5.2　16S rRNA 片段的扩增　应用细菌通用引物 27f(5′-AGAGTTTGATCGGCTCAG-3′);1942r (5′-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3′)进行扩增。每个 PCR 反应体系总体积均为 25 μL,包括 2×*Taq* PCR MasterMix 12.5 μL(编号为 KT201-02,Tiangen),DNA 模板(50 ng/L)1 μL,引物各 1 μL,双蒸水 10.5 μL。PCR 扩增程序:95 ℃变性 5 min;95 ℃ 30 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 1.5 min,40 个循环;72 ℃延伸 10 min。回收大小约 1.5 kb 的 PCR 产物。将其连接到 pGEMT-Easy 载体(Promega corp.,美国)上,转化到大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α 感受态细胞中。重组质粒经 *Not* Ⅰ酶切和 PCR 鉴定后,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.5.3　16S rRNA 系统发育树构建　测序结果

用软件 Chromas(ver. 2. 4. 1)进行序列修正后,在 NCBI 数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)Blast 检索与目标序列同源性高的 DNA 序列,与本文所测菌株序列分别进行比对。利用软件 MEGA(ver. 5. 05)的 UPGMA 构建系统发育树,各分支的置信度自举检测(bootstrap)1 000 次。

1.6 Pcc 亚种特异引物扩增基因

用 Pcc 特异性引物 EXPCCF(5′-GAACTTCGCACCGCCGACCTTCTA-3′)和 EXPCCR(5′-GCCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG -3′)[9] 扩增 5 个分离菌株 pECC2F 序列区域。25 μL 的 PCR 反应体系:DAN 模板 1 μL(100 ng/L),2× *Taq* PCR Master Mix 12 μL,上游引物1 μL(20 μmol/L),下游引物 1 μL(20 μmol/L),加 ddH_2O 至总体积 25 μL。PCR 扩增条件:94 ℃变性 3 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 1.5 min,30 个循环;72 ℃延伸 5 min。以 2 000 bp DNA marker 为分子质量标准,取 4 μL PCR 扩增产物进行20 g/L琼脂糖凝胶电泳检测,核酸染料染色观察是否有特异性条带产生。选用本实验室保存的果胶杆菌致病菌 Pa(Pa11)为对照菌株。

2 结果与分析

2.1 软腐病菌的分离和致病性测定

软腐病病样中分离的菌株经 CVP 选择性培养基筛选,选择在 CVP 培养基上生长的菌株向培养基内部扩展,形成杯状凹陷(图 1-A),将分离的菌株回接到宿主马铃薯块茎上,块茎组织从接种部位开始产生水渍状病变并向接种点周围迅速扩散(图 1-B)。其症状于田间采集的马铃薯软腐病样症状一致,对接种发病的马铃薯块茎组织重新分离病原菌,得到的 5 个菌株均能引起马铃薯块茎软腐症状。

2.2 软腐病菌的形态及生物化学特征分析

软腐病病样中分离的 5 个菌株经 CVP 选择性培养基筛选,在 CVP 培养基上产生凹陷的菌株。将菌株转接到 LB 固体培养基上,菌落形态呈圆形、乳白色、表面光滑,略隆起。革兰氏染色呈阴性。所有测试菌株均可在 37 ℃生长,具有耐盐性,对红霉素不敏感,能使明胶液化,过氧化氢酶反应呈阳性,蔗糖试验还原反应、氧化酶和磷酸酶活性及吲哚产生试验均呈阴性,不能利用 D-麦芽糖、山梨醇、D-阿拉伯糖醇和 α-甲基葡萄糖,但可以利用柠檬酸盐、乳糖、纤维二糖、棉子糖和蜜二糖(表 1),这些结果与报道的胡萝卜果胶杆菌胡萝卜亚种(*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*)的生物学形态特征和生理生化特性均吻合[4]。

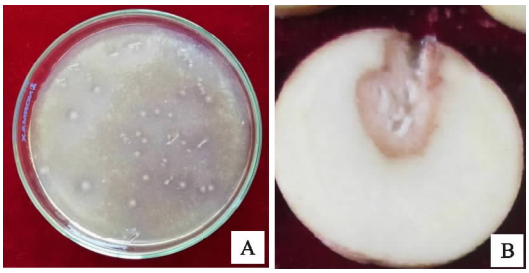


图 1 菌株在 CVP 培养基平板上产生杯状凹陷(A)和接种 48 h 后块茎症状(B)

Fig. 1 Cup-shaped cavities formation of isolated pathogen from diseased tuber of potato in field on CVP agar (A) and symptom of healthy tuber at 48 h after in vitro-inoculation with pathogen (B)

2.3 16S rRNA 的序列分析及系统发育树构建

分离获得的 5 个菌株 QPB-4、QLL-10、QDM-7、QHX-4 和 QHL-2 的 16S rRNA 基因经 PCR 扩增,均得到一条大小约为 1.5 kb 的片段(图 2),与胡萝卜软腐病果胶杆菌 16S rRNA 基因的扩增片段大小近似,在 NCBI 数据库中将测序结果与已知序列进行 BLAST 比对,结果表明,5 个菌株与 Pcc(KR054976.1)的 16S rRNA 基因序列的相似度(或一致性)均达 99%。基于 16S rRNA 基因完整序列,以马铃薯黑胫病致病菌(*Dickeya solani*)菌株 ND14b 为外组,将 5 个菌株的序列与已发表的 38 株软腐菌菌株的序列构建系统发育树(图 3)。结果显示,本研究分离得到的 5 个菌株与已发表的 Pcc 菌株形成的类群构成明显的分枝,已发表的 Pcb 与 Pco 菌株形成的类群构成独立的分枝,Pa 和 Pb 菌株共同组成的类群与 Pw 菌株组成的类群也聚集成另外分枝。

2.4 Pcc 特异性引物扩增

用 Pcc 特异性引物 EXPCCF 和 EXPCCR 扩增 5 个菌株及其对照菌株。结果表明 5 个菌株中均扩增得到一条大小约为 550 bp 的特异性条带(图 4);而在对照菌株 Pcb(BC1)中没有得到扩增产物,由此可见,分离的 5 个菌株均被鉴定为 Pcc。

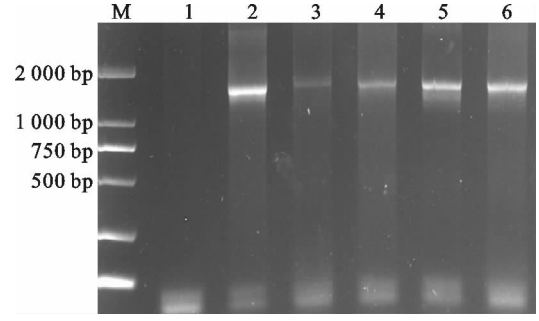
表 1　从田间病薯块茎分离的 5 个菌株的生理生化特征

Table 1　Physiochemical characteristics of 5 strains isolated from diseased tubers of potato plants in field

测试指标 Test indication	5 个分离菌株的测试反应 Response of 5 strains collections to test	已知致病菌(阳性对照) Known strains (Positive control)	
		Pcc (ECC71)	Pa(Pa11)
革兰氏反应　Gram stain	−	−	−
在 CVP 培养基上形成凹陷 Cavity formation on CVP medium	+	+	+
明胶液化　Gelatin liquefaction	+	+	−
柠檬酸盐利用　Utilization of citrate	+	+	+
产酸反应　Acid production from			
蔗糖　Sucrose	−	+	+
D-麦芽糖　D-maltose	−	+	+
山梨醇　D-sorbitol	−	−	−
D -阿拉伯糖醇　D-arabitol	−	−	−
α-甲基葡萄糖　α-methylglucoside	−	+	+
吲哚　Indole	−	−	−
磷酸酶　Phosphatase	−	−	−
过氧化氢酶　Catalase	+	+	+
氧化酶　Oxidase	−	−	−
乳糖　Lactose	+	+	+
纤维二糖　Cellobiose	+	+	+
棉子糖　Raffinose	+	+	+
蜜二糖　Melibiose	+	+	+
37 ℃下生长　Growth at 37 ℃	+	−	−
50 g/L 盐下生长　Growth in 50 g/L NaCl	+	+	+
红霉素敏感性　Sensitivity to erythromycin	−	−	−

注:+. 阳性反应;−. 阴性反应。

Note: + and − indicate positive and negative reactions.



M. DNA marker DL2000;1. 无菌水用作阴性对照　Sterile water used as negative control;2. 菌株 QPB-4　Strain QPB-4;3. 菌株QHL-2　Strain QHL-2;4. 菌株 QDM-7　Strain QDM-7;5. 菌株QLL-10　Strain QLL-10;6. 菌株 QHX-4　Strain QHX-4

图 2　不同分离菌株 16S rRNA PCR 的琼脂糖凝胶电泳

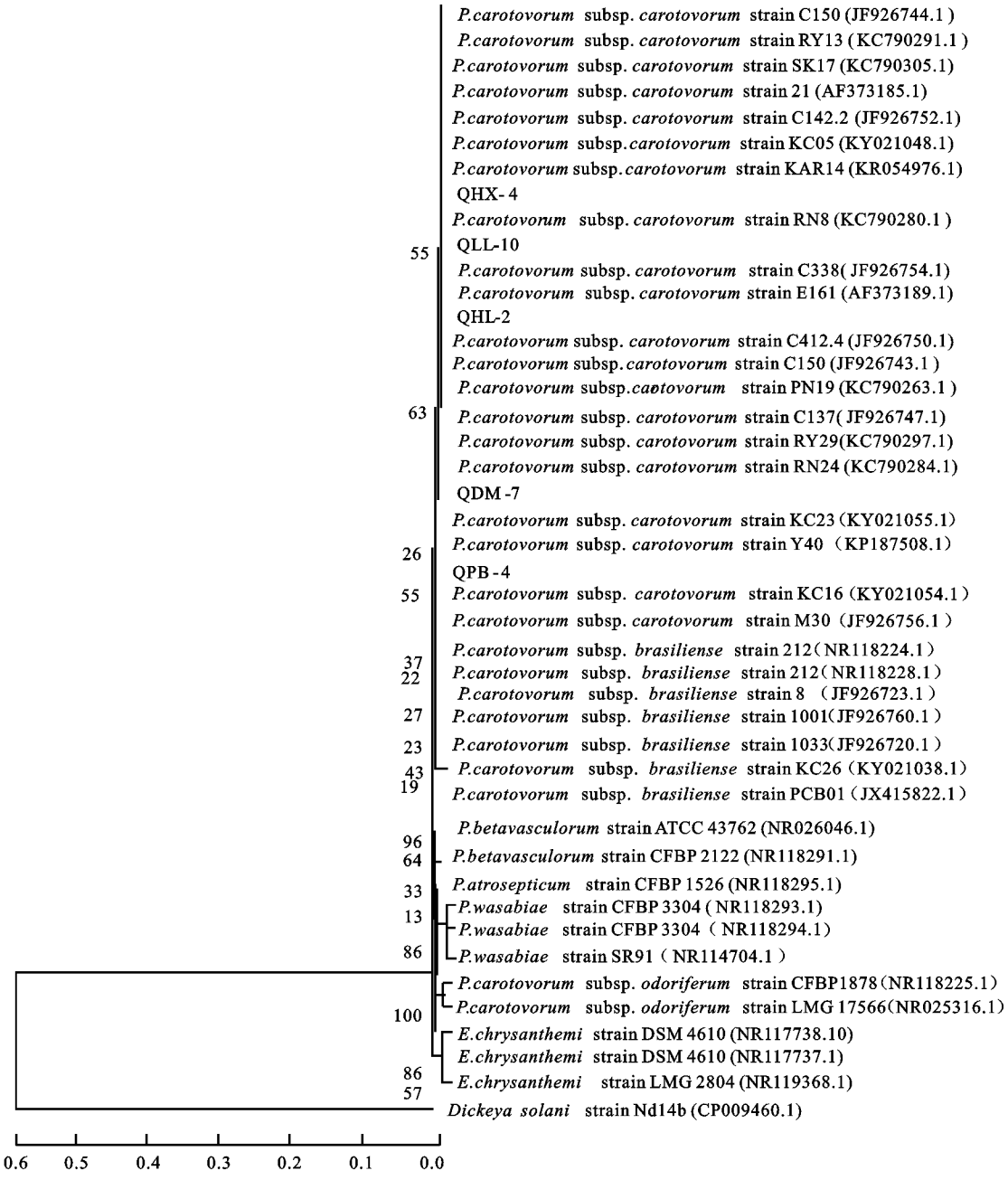
Fig. 2　Ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis showing PCR products amplified in 16S rRNA genes of different strains

2.5　软腐病菌致病力测定

以马铃薯块茎接种病原菌产生的病斑长度作为判定细菌的致病力。块茎竹签伤口接种后72 h时统计病斑长度,发现 5 个菌株之间不存在明显的致病力差异,按病斑长度划分为低、中和高等致病力。Pcc 亚种之间的菌株致病力不存在差异,菌株 QPB-4、QHX-4、QDM-7 和 QLL-10 在接种后 72 h时表现较强致病力,而菌株 QHL-2 表现为中等致病力。同时来自不同地区的菌株致病力差异也不显著(表 2)。

3　结论与讨论

Pcc 是自然条件下寄主种类众多和地理分布最为广泛的植物病原菌,能浸染温带和亚热带地区种植的马铃薯、白菜、甘蓝、胡萝卜、番茄、洋葱、芹菜和黄瓜等数百种蔬菜,以及某些花卉植物,如马蹄莲、菊花、兰花、蝴蝶兰和君子兰等[2]。马铃薯软腐病是马铃薯生产上的重要病害之一,近年由于青海不断扩大马铃薯种植规模,软腐病在青海省的发生范围也蔓延扩大。本研究通过对青



支点上的数字为 Bootstrap 生成的百分率，条形图表示遗传距离 The number at each branch points showed percentage supported by Bootstrap，bar indicated the genetic distance of evolutionary branches

图 3 5 个菌株与其他菌株的 16S rRNA 基于序列构建系统发育树

Fig. 3 Phylogenic tree based on blast results of 5 strains Pectobacterium 16S rRNA sequence

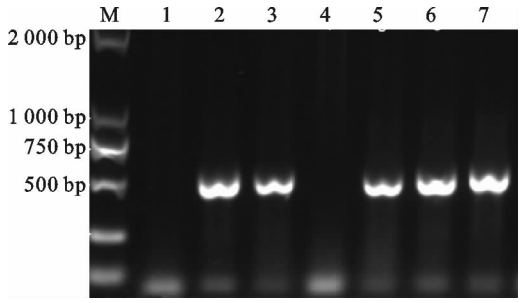
表 2 5 个 Pcc 菌株的采集地点及致病力等级

Table 2 Sampling sites and pathogencity level of 5 Pcc strain collections

菌株编号 Strain number	采样地点 Sampling site	病斑直径的平均长度/mm Average length of diseased lesion diameter	致病力水平 Pathogenic level
QPB-4	平安县三合镇冰岭山村 Binglinshan，Sanhe，Ping'an County	10.4 a	H
QHX-4	互助县西山乡新合村 Xinhe，Xishan，Huzhu County	10.1 a	H
QHL-2	湟中县拦隆口镇拦隆口村 Lanlongkou，Huangzhong County	9.8 a	M
QDM-7	大通县朔北乡马家庄 Majiazhuang，Shuobei，Datong County	10.3 a	H
QLL-10	乐都县蒲台乡李家村 Lijia，Putai，Ledu County	10.5 a	H

注：M. 致病力中等；H. 高致病力。

Note: M. moderate pathogenicity; H. high pathogenicity.



M. DNA marker DL2 000; 1. 无菌水用作阴性对照　Sterile water used as negative control; 2. 菌株 QPB-4　Strain QPB-4; 3. 菌株QHL-2　Strain QHL-2; 4. 菌株 Pa(Pa11)　Strain Pa (Pa11); 5. 菌株 QLL-10　Strain QLL-10; 6. 菌株 QHX-4　Strain QHX-4; 7. 菌株 QDM-7　Strain QDM-7

图 4　分离的 5 个不同菌株 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 4　Ethidium bromide-stained agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from 5 different strain collections

海省马铃薯软腐病的病原菌分离、形态观察、致病性测定及 16S rDNA 基因序列比较,明确引起青海省马铃薯软腐病的病原为胡萝卜果胶杆菌胡萝卜亚种(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)。该亚种引发马铃薯软腐病,此后导致西椒、胡萝卜和万年青植物的软腐病,也有巴西、摩洛哥等国家马铃薯软腐病来源于该菌系[10-15]。5 个菌株的形态表型特征与果胶软腐杆菌(*Pectobacterium*)相似。进一步测定该病原菌的生理生化特征,包括过氧化氢酶、氧化酶产生、明胶液化、蔗糖还原、磷酸酶活性、吲哚产物、对红霉素的敏感性、碳水化合物产酸、有机盐产酸、37 ℃生长及 50 g/L NaCl 溶液中的生长情况,与胡萝卜果胶杆菌胡萝卜亚种(Pcc)特征完全一致[4]。不同于 Pa 与 Pw 菌系低于 36～37 ℃的生长特性,又有别于 Pb 菌系不能利用柠檬酸和明胶的特性,5 个菌株与参试菌株 Pall 均可以在 37 ℃和 5 g/L NaCl 培养基中正常生长,具备降解柠檬酸和明胶特征,这与 Pc 菌株表现一致,支持其属于 Pc 种的归类[16-18]。

DNA 标记、血清学和 DNA 杂交在许多植物病原细菌致病亚种和致病型区分方面有报道,其中 16S rRNA 序列分析是目前主要的细菌系统发育分类方法[19]。为了进一步明确病原菌的亚种分类地位,对测试菌株的基因组进行分析。通过对 16S rRNA 基因序列分析,结合 Pcc 亚种 pECC2F 序列特异性引物扩增,将分离得到的 5 个软腐病菌均鉴别为 Pcc。16S rRNA 基因完整的序列分析及系统进化树结果将分离得到的 5 个软腐菌与已发表的 Pcc 菌系共同形成明显的 Pcc 分支,且该分支中与 Pco 和 Pcb 归为不同类群;利用 Pcc 亚种 pECC2F 序列的特异性引物在 Pcc 菌系中均扩增出 1 条大小约 550 bp 的 Pcc 特异条带,而 Pcb 菌株无扩增产物。此外,EXPCC 特异性引物扩增方法也可用于 Pcb 亚种的鉴定[20]。Onkendi 等[21]报道用 EXPCCF/EXPCCR 特异性引物在 Pcc 菌系中扩增得到 550 bp 的特异性条带,而 Pcb 中无扩增产物。Nabhan 等[18]研究认为 16S rRNA 仅能区分细菌种的差异,而不能对亚种进行区分,但本研究在 5 个 Pcc 菌株中,有 2 个 Pcc 菌株与已发表的 Pcc 菌系聚集成由 Pcc 菌株构成的亚类群,而遗传关系相对较远的 Pco 和 Pcb 菌株单独成群。可见,基于 16S rRNA 基因序列在一定程度上也揭示亚种之间的遗传关系。

本研究致病力鉴定结果发现 5 个菌株不存在明显的致病力差异,亚种内不同地区的菌株之间也不存在明显的致病力分化。据文献报道,马铃薯细菌性软腐病多为 Pcc 亚种所致[10,12,22-24]。但本研究在青海省其他地区马铃薯软腐病病样中也分离到 Pcb 和 Pco,用该亚种接种马铃块茎茎亦能引起植株块茎软腐症状,但接种马铃块茎茎软腐程度不同,并且 Pcb 和 Pco 菌株占分离菌株的比例不高。因此引起青海省马铃薯软腐病的病原主要是 Pcc。关于 Pcc 与 Pcb、Pco 二者或三者在青海春种马铃薯产区的分布、扩散及复合浸染有待进一步研究。

参考文献　Reference:

[1] 王　舰,王　芳. 2013 年青海省马铃薯产业发展现状与可持续发展[C]//中国马铃薯大会. 黑龙江:大兴安岭加格达奇区,2014:162-165.
WANG J, WANG F. Development status and sustainable development of potato industry in Qinghai province in 2013 [C] // Chinese Potato Congress. Greater Khingan Mountains. Heilongjiang: Jiagedaqi District, 2014: 162-165.

[2] PEROMBELON M C M. Potato disease caused by soft-rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis [J]. *Plant Pathology*, 2002, 51(1): 1-12.

[3] TOTH I K, BELL K S, HOLEVA M C, *et al*. Soft-rot *Erwinae*: from genes to genomes [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2003, 4(1): 17-30.

[4] CHOI O, KIM J. *Pectobacteriumcarotovorum* subsp. *brasiliense* causing soft rot on paprika in Korea [J]. *Journal of*

Phytopathology,2013,161(2):125-127.

[5] CZAJLOWSKI R,PROMBELON M C M,UANEEN J A,*et al*. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species:a review [J]. *Plant Pathology*,2011,60(6):999-1013.

[6] NGADZE E,BRADY C L,COUTINHO T A,*et al*. Pectinolytic bacteria associated with potato soft rot and blackleg in South Africa and Zimbabwe [J]. *European Journal of Plant Pathology*,2012,134(3):533-549.

[7] 方中达.植病研究方法(第 3 版)[M].北京:中国农业出版社,1998:12-164.
FANG ZH D. Plant Nathology Research Methods (3rd version)[M]. Beijing:China Agriculture Press,1998:12-164.

[8] GARRITY G M, BELL J A, LILBURN T G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [M]. Berlin: Springer Verlag, 2004.

[9] KANG H,KWON S W,GO S J. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band [J]. *Plant Pathology*, 2003,52(2):127-133.

[10] FAQUIHI H,TERTA M,AMDAN M,*et al*. Phenotypic and genotypic diversity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing soft rot disease of potatoes in Morocco [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2015,143(4):801-811.

[11] YAHIAOUI-ZAIDI R, JOUAN B, ANDRIVON D. Biochemical and molecular diversity among *Erwinia* isolates from potato in Algeria [J]. *Plant Pathology*,2003,52(1): 28-40.

[12] GALLELLI A,GALLI M,SIMONEDD,*et al*. Phenotypic and genetic variability of *Pectobacterium carotovorum* isolated from artichoke in the Selevalley [J]. *Journal of Plant Pathology*,2009,91(3):757-761.

[13] MAISURIA V B,NERURKARA S. Characterization and differentiation of soft rot causing *Pectobacterium carotovorum* of Indian origin [J]. *European Journal of Plant Pathology*,2013,136(1):87-102.

[14] MA B,HIBBING M E,KIM H S,*et al*. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya* [J]. *Phytopathology*, 2007,97(9):1150-1163.

[15] DUARTE V,BOERS H D,WARD L J,*et al*. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil [J]. *Journal of Applied Microbiology*,2004,96(3):535-545.

[16] GARDAN L,GOUY C,CHRISTEN R,*et al*. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotouorum* to species level:*Pectobacterium atrosepticum* sp nov,*Pectobacterium betavasculorum* sp nov and *Pectobacterium wasabiae* sp nov[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*,2003,53(2):381-391.

[17] GALLOIS A,SAMSON R,AGERON E,*et al*. *Erwiniacarotovora* subsp. *odorifera* subsp. nov., associated with odorous soft rot of chicory(*Cichorium intybus* L.)[J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*,1992,42(4):582-588.

[18] NABHAN S,BOER S H D,MAISSE,*et al*. Taxonomic relatedness between *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* subsp. nov[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113(4):904-913.

[19] MAHMOUDI E,SOLEIMANI M J,TAGHAVI M. Detection of bacterial soft-rot of crown imperial caused by*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* using specific PCR primers [J]. *Phytopathologia Mediterranea*, 2007, 46(2):168-176.

[20] NABHAN S,WYDRA K,LINDE M,*et al*. The use of two complementary DNA assays, AFLP and MLSA, for epidemic and phylogenetic studies of petolytic enterobacterial strains with focus on the heterogeneous species *Pectobacterium carotovorum* [J]. *Plant Pathology*, 2012, 61(3): 498-508.

[21] ONKENDI E M, MOLELEKI L N. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *brasiliense* from diseased potatoes in Kenya [J]. *European Journal of Plant Pathology*,2014,139(3):557-566.

[22] PITMAN A R,WRIGHT P J,GALBRAITH M D,*et al*. Biochemical and genetic diversity of pectolytic enterobacteria causing soft rot disease of potatoes in New Zealand [J]. *Australasian Plant Pathology*,2008,37(6):559-568.

[23] SEO S T,FURUYA N,LIM C K,*et al*. Phenotypic and genetic diversity of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* strains from Asia[J]. *Journal of Phytopathology*, 2002, 150(3):120-127.

[24] TERTA M,EI KARKOURI A,AIT MHANDR,*et al*. Occurrence of *Pectobacterium carotovorum* strains isolated from potato soft rot in Morocco[J]. *Cellular and Molecular Biology*,2010,56:1324-1333.

Identification of Soft Rot Pathogen on Potato (*Solanum tuberosum* L.) in Qinghai Province

WANG Xin[1,2], CHENG Liang[2,3], CAI Xiaojian[1,2], WANG Yayi[1,2], GAO Xusheng[1,2], and LI Songling[1,2]

(1. Soil and Fertilizer Institute, Qinghai Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining 810016, China; 2. State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016, China; 3. Plant Protection Institute, Qinghai Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining 810016, China)

Abstract To identify causal pathogen causing soft rot of potato(*Solanum tuberosum* L.) in Qinghai province, five strains isolated from five counties in Qinghai were characterized by morphological, biochemical and physiological methods, and analysed 16S rRNA sequence as well as Pcc subspecies pECC2F region. The results indicated that all of the five strains were pathogenic to potato and caused root rot of potato, so we suggest that *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* was the soft rot pathogens on potato (*Solanum tuberosum* L.) in Qinghai. The physiological and biochemical tests showed the bacterium grown at 37 ℃, caused gelatin liquefaction, represented the tolerance to saltin 50 g/L NaCl solution, and had no sensitivity to erythromycin. The bacterium also gave a positive response to catalase, but negative responses to oxidase, phosphatase activity, indole production, and sucrose reduction reaction. The bacterium utilized some substances including citrate, lactose, cellobiose, raffinose, and melibiose, could not utilize D-maltose, D-sorbitol, D-arabitol, and α-methylglucoside. The pathogenicity tests of all of the bacterial strain collections showed that no significant difference among the same subspecies isolated from different regions was found in Qinghai.

Key words *Solanum tuberosum* L.; Soft rot disease; Pathogenicity; Pathogen identification; Qinghai

Received 2017-05-26　　**Returned** 2017-06-21

Foundation item The Project of Science and Technology Department of Qinghai Province (No. 2015-ZJ-705); Youth Scientific Research Foundation of Qinghai University (No. 2014-QNY-7, No. 2015-QNY-2).

First author WANG Xin, female, associate research fellow. Research area: plant pathology. E-mail: wangx710@163.com

Corresponding author LI Songling, male, research fellow. Research area: soil microbiology. E-mail: 465883114@qq.com

(责任编辑:顾玉兰　Responsible editor: GU Yulan)