

软腐白菜细菌群落结构多样性与生长环境的相关性

杜迅¹, 胡宜亮¹, 何蔚荭², 陈国参¹, 王腾飞¹, 仇雨晨³, 王亚南^{1,2*}

河南省科学院生物研究所有限责任公司¹, 河南省微生物工程重点实验室², 河南省微生物菌种资源库, 郑州 450008

³ 郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 郑州 450002

摘要: 【目的】通过对比分析不同生境白菜软腐病变组织与根系土壤相关细菌的群落结构, 探讨白菜软腐细菌种群的多样性, 以及与生境土壤细菌种群的相关性。【方法】样品取自河南省 2 个不同生态型白菜田, 以成熟白菜软腐组织及病株根系土壤为目标, 利用模拟原环境的培养基成分和条件, 对样品中的细菌进行高通量分离培养和细胞 16S rRNA 基因序列比对分析, 获得各样品细菌种群结构及其丰度, 进而对各样品的优势菌群进行对比分析。【结果】两种不同生境白菜软腐组织细菌总量 M05T 为 4.0×10^8 cell/g, Q2T 为 1.2×10^{11} cell/g, 分别获得纯菌 56 株和 85 株。M05T 优势菌为萎蔫短小杆菌萎蔫亚种 (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens*); Q2T 优势菌为假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.) (栖木槿假单胞菌 (*P. hibiscicola*)、台湾假单胞菌 (*P. taiwanensis*)、托木尔假单胞菌 (*P. tuomuerensis*)、莫塞尔假单胞菌 (*P. mosselii*))。根系土壤细菌总量 M05S 为 2.7×10^5 cell/g, Q2S 为 6.2×10^7 cell/g, 分别获得纯菌 36 株和 70 株。M05S 优势菌为巨大芽胞杆菌 (*Bacillus megatherium*); Q2S 优势菌为假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.) (香鱼假单胞菌 (*P. plecoglossicida*)、栖木槿假单胞菌 (*P. hibiscicola*)、类黄色假单胞菌 (*P. parafulva*)、蒙氏假单胞菌 (*P. monteilii*)、膝形假单胞菌 (*P. geniculata*))。【结论】依据不同生境的白菜软腐组织和根系土壤细菌群落结构对比分析, 认为白菜软腐菌可能具有多样性和多种致病来源, 本研究为软腐病多种防治措施的制定提供基础研究和菌种资源。

关键词: 软腐白菜, 根系土壤, 人工白菜培养基, 16S rRNA 基因序列, 优势菌群

中图分类号: S718.54+2 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 12-1639-07

白菜软腐病 (Soft rot of Chinese cabbage) 是一种由细菌引起的、世界范围内的植物病害^[1]。细菌细胞主要通过分泌大量果胶酶, 使植物组织的薄壁细胞被浸离降解, 引起植物软腐病变^[2]。尽管许多种细菌都能产生果胶酶, 但目前研究认为只有少数几种细菌能引起植物软腐病^[3]。这些细菌主要包括果胶杆菌属 (*Pectobacterium* spp.) (原欧文氏杆菌属

(*Erwinias*) 中的胡萝卜软腐组群^[4])、芽胞杆菌属 (*Bacillus* spp.) (枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*)、巨大芽胞杆菌 (*Bacillus megatherium*)、多粘芽胞杆菌 (*Bacillus polymyxa*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium* spp.)、假单胞菌属 (*Pseudomonas* spp.) (边缘假单胞菌 (*Pseudomonas marginalis*) 以及产果胶酶的假单胞菌 (pectolytic strains of *Pseudomonas*))^[5], 其中, 欧

基金项目: 国家重点实验室资助项目 (MELRS0940)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-371-63382181; E-mail: wangyanan@mail.tsinghua.edu.cn

作者简介: 杜迅 (1964–), 女, 河南登封人, 副研究员, 从事微生物资源利用与开发研究。E-mail: duxun777@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-06-24; 修回日期: 2011-08-15

文氏软腐菌 (the soft rot erwinias) 是目前国内研究较多的软腐病原菌^[6], 即欧文氏杆菌属 (*Erwinias*) (果胶杆菌属, *Pectobacterium*) 的几个种或亚种^[7], 少有研究假单胞菌和芽胞杆菌。

据文献报道, 植物软腐病的病原菌和宿主之间缺乏特异性, 即同一种软腐病原菌能引起多种植物软腐病变; 一种植物的软腐病也可同时由几种细菌引起^[8-9], 因此, 软腐病原菌具有多样性, 软腐病原菌来源和软腐病变机制也存在多型性。本研究在以往研究的基础上, 对软腐病相关细菌分离培养方法做了一些改进, 从提高样品微生物可培养性和高通量纯培养、测序和比对分析大量数据结果, 研究白菜软腐病变组织细菌群落的多样性, 并结合根系土壤中可利用白菜营养成分生长的微生物种类, 探讨白菜软腐病与种植环境的相关性, 以期分析软腐菌来源, 为软腐病致病机理和防治措施的研究提供基础研究和菌种资源。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品: 郑州蔬菜研究所大白菜试验田的“郑杂5号”白菜软腐组织及其根系土壤, 简称试验田和 M05, 样品编号为 M05T 和 M05S; 河南省濮阳市王助乡菜农种植的“秦白2号”大白菜软腐组织及其根系土壤, 简称农田和 Q2, 样品编号为 Q2T 和 Q2S。

1.1.2 培养基: ①初始分离培养基 (g/L): 酵母粉 1.0; 白菜浆 500 mL; 琼脂 1.5%, pH 6.0, 115°C 灭菌 25 min。②细胞富集纯化用人工白菜培养基 (Artificial Chinese cabbage Medium, AC) (g/L): 蛋白胨 3.0; 酵母粉 1.0; 葡萄糖 5.0; NaCl 0.38; K₂HPO₄ 0.48; CaCl₂ 0.32; MgSO₄ 0.10; 维生素溶液 1 mL, 微量元素溶液 1 mL; 琼脂 1.5%, pH 6.0-6.5, 115°C 灭菌 25 min。维生素溶液组成 (g/L): V_C 78; V_E 1.5; 烟酸 1.3; 胡萝卜素 0.42; V_{B2} 0.12; V_{B1} 0.1; V_A 0.07。微量元素溶液组成 (mg/L): FeSO₄ 830.0; MnSO₄ 350.0; ZnSO₄ 350.0; CuSO₄ 0.05; Na₂SeO₃ 0.55。③细胞传代转接用 LB 培养基 (g/L): 蛋白胨 10.0; 酵母粉 5.0; NaCl 10.0, 固体培养基加 1.5% 琼脂, pH 6.5, 115°C 灭菌 25 min。参比菌株胡萝卜果胶杆菌均能在上述培养基上良好生长。

1.1.3 主要仪器和试剂: SHKE5000-8CE 恒温摇床 (美国 Thermo 公司), 3K15 冷冻离心机 (Sigma 公司), PCR 扩增仪 (德国 Biometra 公司); 通用引物合成由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司完成; 基因测序由诺赛生物技术有限公司完成。

1.2 样品预处理

白菜软腐组织样品预处理, 用无菌手术刀分别取根茎结合部位褐变软腐组织各数份, 充分捣碎, 混合均匀备用。病株根系土壤样品预处理, 同样用无菌手术刀取贴近软腐白菜根部的土壤数份样品, 充分混匀备用^[10]。

1.3 分离培养和纯化

准确称取 0.1 g 混合均匀的各样品, 分别用无菌生理盐水梯度稀释, 取各梯度稀释液 100 μL 于初始分离培养基平板上均匀涂布, 30°C 恒温培养 24 h。以可计数平板 (生长有 50-200 个菌落平板) 进行细菌计数, 同时挑取各菌落于同样的培养基斜面, 作为初始分离菌株编号。采用人工白菜培养基, 以平板划线法, 纯化斜面富集培养的各菌株, 直至获得菌株纯培养。

1.4 菌株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增和测序

采用细胞 16S rRNA 基因序列比对分析结果对获得纯培养的菌株进行初步鉴定。实验方法为提取纯菌株的基因组 DNA^[11], 通用引物 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' 和 27F: 5'-AGAGTTT ATCCTGGCTCAG-3' 扩增 16S rRNA 基因, 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物并送交北京诺赛公司测序, 测序结果于 GenBank 或 EzTaxon server 2.1 中比对分析, 最终获得各菌株的初步鉴定结果。

2 结果

2.1 白菜软腐组织和根系土壤细菌群落结构及其分布

2.1.1 白菜软腐组织和根系土壤细菌数量: 培养基和培养条件对细菌的分离培养至关重要。本研究初始分离采用健康白菜组织捣碎制备的白菜浆培养基, 后续菌株纯化采用人工白菜培养基 (根据白菜成分配制)。获得纯培养的菌株采用 LB 培养基传代培养。

表 1 是本次实验采集的 4 份样品中能利用白菜

成分生长的细菌总量、分离获得纯菌株数量和归类属种数量。样品分别是“郑杂 5 号”软腐白菜组织及其根系土壤 (M05T 和 M05S) 和“秦白 2 号”软腐白菜组织及其根系土壤 (Q2T 和 Q2S)。可以看出,在细菌数量方面,白菜软腐组织均高于其根系土壤,即 Q2T > Q2S 和 M05T > M05S;同时,无论是白菜软腐组织还是根系土壤中,试验田样品均低于相应的农田样品,即 M05T < Q2T 和 M05S < Q2S。结果表明:其一,白菜软腐组织中细菌滋生严重,试验田和农田中白菜软腐组织细菌总数分别为 10^8 和 10^{11} ;其二,农田的细菌数量整体高于试验田。农田土壤比试验田土壤细菌总数高 10^2 倍,农田白菜比试验田白菜软腐组织细菌总数高 10^3 倍。这可能与蔬菜所试验田与农田白菜的种植环境差异相关。蔬菜所白菜施用实验室配置的有机肥,灌溉用深层地下水 (400 m 深井水);而农田施用农家肥和化肥,灌溉用地表沟渠水,环境条件复杂,容易受到污染。

表 1 各样品分离获得的细菌总量、纯菌株数量和归类属种数量

Table 1 Number of Genus, Species, total bacteria and pure strains isolated from four samples

Number of Sample	M05T	M05S	Q2T	Q2S
Number of total bacteria	4.0×10^8	2.7×10^5	1.2×10^{11}	6.2×10^7
Number of pure strains	56	36	85	70
Number of genuses	5	6	8	10
Number of species	8	7	14	16

2.1.2 白菜软腐组织和根系土壤细菌种群结构及其分布:样品 M05T、M05S、Q2T 和 Q2S 中细菌菌株的获得,采用有效计数平板上生长的全部菌落逐一挑取、逐个纯化的方法,旨在分析细菌的群落结构及各属种细菌丰度。各样品菌株纯化后的菌株数量见表 1。4 份样品共计 247 株纯菌株。

进一步依据细胞形态特征和 16S rRNA 基因片段序列分析,对分离获得的 247 株纯菌株进行初步分类和鉴定,得出各菌体细胞所分别归属的细菌类群,结果见表 2。

表 2 各样品细菌种群结构和丰度

Table 2 Bacterial population and abundance in each of the four samples

Genus	M05T			M05S			Q2T			Q2S		
	* a	* b	* c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
I <i>Pseudochrobactrum</i>		0			0			0		2	1	2.9%
<i>Rhizobium</i>				1	1	2.7%					0	
II <i>Comamonas</i>		0			0					8	1	11.4%
III <i>Enterobacter</i>		0			0		1	1	1.2%	4	2	5.7%
<i>Klebsiella</i>		0			0					5	1	7.1%
<i>Proteus</i>	1	1	1.8%		0						0	
<i>Providencia</i>	2	2	3.6%		0		6	2	7.1%		0	
<i>Acinetobacter</i>	4	1	7.3%	1	1	2.7%	17	2	20%		0	
<i>Pseudomonas</i>		0		1	1	2.7%	51	4	60%	24	5	34.3%
<i>Stenotrophomonas</i>		0		1	1	2.7%	5	2	5.9%	8	1	11.4%
IV <i>Bacillus</i>	4	2	7.3%	29	2	78.4%		0			0	
<i>Staphylococcus</i>		0			0		1	1	1.2%		0	
<i>Vagococcus</i>		0			0		2	1	2.4%		0	
V <i>Brevibacterium</i>		0		4	1	10.8%		0			0	
<i>Curtobacterium</i>	45	2	80%		0			0			0	
<i>Microbacterium</i>		0			0					2	2	2.8%
<i>Arthrobacter</i>		0			0					2	1	2.8%
VI <i>Empedobacter</i>		0			0		2	1	2.4%	14	1	20.0%
<i>Myroides</i>		0			0			0		1	1	1.4%

* a: strains number; * b: species; * c: abundance = strains number / total strains number; I: *Proteobacteria*; *Alphaproteobacteria*; II: *Proteobacteria*; *Betaproteobacteria*; III: *Proteobacteria*; *Gammaproteobacteria*; IV: *Firmicutes*; *Bacillales*; V: *Actinobacteria*; *Actinobacteridae*; VI: *Bacteroidetes*

从表 1 和表 2 可以看出,虽然白菜软腐组织中细菌数量多,但是种类少,具有极其显著的优势菌类群。“郑杂 5 号”白菜软腐组织中细菌总量为

10^8 , 主要分布在 5 个属的 8 个种,其中短小杆菌属 (*Curtobacterium*) 的 2 个种为绝对优势菌群 (占该区系菌株总数 80% 左右);“秦白 2 号”白菜软腐

组织中细菌总量为 10^{11} , 主要分布在 8 个属的 14 个种, 其中假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的 4 个种为优势菌群 (占该区系菌株总数 60% 左右), 不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 的 2 个种也有相当含量 (占该区系菌株总数 20% 左右)。同时还可以看出 2 个白菜样品的软腐组织细菌优势菌群显著不同。

对比表 1 和表 2 中两个不同种植环境土壤样品的细菌菌群, 可以看出, 试验田土壤中能利用白菜养分生长的细菌种类较少, 分布在 6 个属的 7 个种, 芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的 2 个种为显著优势菌群 (占该区系菌株总数 78% 左右); 农田土壤中能利用白菜养分生长的细菌种类较多, 分布在 10 个属的 16 个种, 假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的 5 个种较为优势 (占该区系菌株总数 34% 左右), 另有稳杆菌属 (*Empedobacter*) 1 个种占 20%、丛毛单胞菌属 (*Comamonas*) 和寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*) 各 1 个种分别占 11%。体现了试验田长期施用单一有机肥、土壤富营养和农田施肥灌溉多类型、土壤环境复杂的特点。

2.1.3 不同白菜软腐组织细菌种群结构比较: 表 2 给出了两种白菜软腐组织样品细菌归类至属的结

果, 已经可以看出优势细菌种群的显著差异, 但样品间在不动杆菌属和普罗威登斯菌属存在菌群的交集, 特别是不动杆菌属的细菌在 Q2T 中具有一定的优势。而进一步分析这些菌株分类至种的结果 (见表 3), 则发现两个样品间菌种的差异仍然存在。首先, 从表 3 可以清楚看出两个样品差异显著的优势细菌分别是, M05T 为短小杆菌属的萎蔫短小杆菌 (*C. flaccumfaciens*) 和产碱短小杆菌 (*C. ammoniigenes*) 2 个种, Q2T 为假单胞菌属的柘木槿假单胞菌 (*P. hibiscicola*)、台湾假单胞菌 (*P. taiwanensis*)、托木尔假单胞菌 (*P. tuomuerensis*) 和莫塞尔假单胞菌 (*P. mosselii*) 4 个种; 其次, 两个样品归类在不动杆菌属的菌株是完全不同的菌种, M05T 只存在乙酸钙不动杆菌 (*A. calcoaceticus*) 1 个种, Q2T 存在约氏不动杆菌 (*A. johnsonii*) 和孤立不动杆菌 (*A. soli*) 2 个种。两个软腐白菜组织样品中均存在普罗威登斯菌属的雷氏普罗威登斯菌 (*P. vermicola*) 和蠕虫普罗威登斯菌 (*P. vermicola*) 2 个种, 但其在菌群中的比例分别 < 5% (M05T 样品) 和 < 10% (Q2T 样品)。结果发现, 两种白菜软腐组织中的细菌种群各具特点, 没有显著相同的细菌, 即软腐菌可能具有多样性的特点。

表 3 两种白菜软腐组织中细菌种的归属

Table 3 Bacterial species in each of the two soft root cabbage tissues

Genus	Q2T		M05T	
	* A	* B	A	B
* I	<i>Enterobacter</i>	<i>E. cancerogenus</i>	1	0
	<i>Proteus</i>	0		<i>P. vulgaris</i>
	<i>Providencia</i>	<i>P. vermicola</i>	5	<i>P. rettgeri</i>
		<i>P. vermicola</i>	1	<i>P. vermicola</i>
	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. johnsonii</i>	14	<i>A. calcoaceticus</i>
		<i>A. soli</i>	3	
		<i>P. hibiscicola</i>	36	0
	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. taiwanensis</i>	11	0
		<i>P. tuomuerensis</i>	3	0
		<i>P. mosselii</i>	1	0
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>S. maltophilia</i>	3	0	
	<i>S. humi</i>	2	0	
* II	<i>Bacillus</i>	0		<i>B. subtilis</i>
		0		<i>B. amyloliquefaciens</i>
	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. saccharolyticus</i>	1	0
	<i>Vagococcus</i>	<i>V. fluvialis</i>	2	0
* III	<i>Curtobacterium</i>	0		<i>C. flaccumfaciens</i>
		0		<i>C. ammoniigenes</i>
* IV	<i>Empedobacter</i>	<i>E. brevis</i>	2	0

* A: Specie; * B: Numbers of the specie. * I: Proteobacteria; Gammaproteobacteria; * II: Firmicutes; Bacillales; * III: Actinobacteria; Actinobacteridae; * IV: Bacteroidetes

2.1.4 白菜软腐组织与种植环境细菌种群的相关性: 对比分析白菜软腐组织与其种植土壤中细菌种群结构。从表 2 中明显可以看出, 试验田“郑杂 5 号”白菜软腐组织与其根系土壤的菌群结构几乎完全不同, 仅在芽胞杆菌属和不动杆菌属有同属菌株少量分离, 但这些菌株详细分类至种(见表 4), 可以看出, 归类在同一属的菌株是完全不同的菌种, 表明该实验田种植的白菜软腐组织的细菌与其种植土壤的细菌种群间没有相关性。而农田“秦白 2 号”白菜软腐组织与其根系土壤的菌群结构存在 4 个属菌

株的一致性, 特别是优势种群假单胞菌属和稳杆菌属。将两个样品同属内菌株分类至种列于表 5, 也可以看出, 相同的细菌分别是栖木槿假单胞菌 (*P. hibiscicola*)、短稳杆菌 (*E. brevis*)、生癌肠杆菌 (*E. cancerogenus*) 和嗜麦芽寡养单胞菌 (*S. maltophilia*), 这些相同细菌细胞量占对应区系细胞总量的比例, 在软腐组织中是 50%, 在土壤中是 44%, 仅在各类群结构比例上存在差异, 表明该农田种植的白菜软腐组织与其种植土壤间存在一定的相关性。

表 4 “郑杂 5 号”白菜软腐组织与根系土壤菌株同属内种间异同比较

Table 4 Difference of bacterial species in the same genus between the isolates from soft rot tissues of “Zhengza No. 5” cabbages and rhizospheric soil

Genus	M05T		M05S	
	Specie	* Number	Specie	* Number
<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i>	2	<i>B. megaterium</i>	28
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	2	<i>B. endophyticus</i>	1
<i>Acinetobacter</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	4	<i>A. lwoffii</i>	1

* species number of genus

表 5 “秦白 2 号”白菜软腐组织与根系土壤菌株同属内种间异同比较

Table 5 Difference of bacterial species in the same genus between the isolates from soft rot tissues of “QinBai No. 2” cabbages and rhizospheric soil

Genus	Q2T		Q2S	
	Specie	* Number	Specie	* Number
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. hibiscicola</i>	36	<i>P. hibiscicola</i>	8
	<i>P. taiwanensis</i>	11	<i>P. plecoglossicida</i>	11
	<i>P. tuomuerensis</i>	3	<i>P. parafulva</i>	2
	<i>P. mosselii</i>	1	<i>P. montelii</i>	2
<i>Empedobacter</i>	<i>E. brevis</i>	2	<i>P. geniculata</i>	1
			<i>E. brevis</i>	14
<i>Enterobacter</i>	<i>E. cancerogenus</i>	1	<i>E. cancerogenus</i>	1
			<i>E. aerogenes</i>	3
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>S. maltophilia</i>	3	<i>S. maltophilia</i>	8
	<i>S. humi</i>	2		

* specie number of the genus

从实验数据可以看出, 软腐组织细菌与土壤环境细菌间存在相关性, 具有土传发病的可能性, 但同时还发现, 软腐病也存在非土传的其他致病途径的可能性。

3 讨论

3.1 白菜软腐组织细菌多样性探讨

以往的软腐菌研究, 较多采用结晶紫果胶酸盐

培养基(CVP)^[12],以降解果胶特征菌落形态为筛选目标,获得的植物(特别是蔬菜类)软腐病原菌主要是果胶杆菌属的几个种或亚种,如 *Ecc*、*Eca*. 和 *Ech* 等^[13]。本实验初始分离采用白菜自然成分为培养基,富集纯化用人工白菜培养基,以胡萝卜果胶杆菌为对照菌株,分离软腐组织中能利用白菜成分的细菌,最终并未分离到该类群菌株,同时,不同的白菜软腐组织中的优势菌类群存在显著的差异。本研究分析认为,不同的生境条件下,植物的软腐菌或菌群可能存在差异,即自然环境的植物软腐菌存在一定的多样性,近几年不断有新的软腐病原菌被发现和报道^[14]也证实了这一点。软腐组织中的优势菌群是否是致病菌、或者其种群结构中何种细菌是致病菌,还有待进一步实验筛选和致病性检验。

3.2 白菜软腐菌与种植土壤的相关性讨论

白菜软腐菌与环境微生物间的相关性研究有助于软腐病感染源的分析,对防治该类病变有指导性的作用。长期以来,普遍认为植物病原菌通过空气、土壤和灌溉水传播,以及植物种子遗传。在本实验中,试验田种植的白菜消除了来自于种子(种子为杂交选育和脱毒的良种)和灌溉水(深井地下水)传播软腐病菌的因素,因此,土传软腐病菌是本文探讨的一个主要方面。研究结果表明白菜软腐病存在土传和非土传的可能性。

致谢 本项研究得到了郑州市蔬菜研究所应芳卿老师协助采样,中国农业科学院王旭明老师提供参比菌株和研究建议。

参考文献

- [1] Ren JP, Petzoldt R, Dickson MH. Screening and identification of resistance to *Erwinia carotovora* in *Brassica rapa* crops. *Euphytica*, 2001, 118 (3): 271-280.
- [2] 任欣正. 植物病原细菌的分类和鉴定. 北京:中国农业出版社, 1994.
- [3] Atallah ZK, Stevenson WR. A methodology to detect and quantify five pathogens causing potato tuber decay using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 2006, 96(9): 1037-1045.
- [4] 藏威, 崔崇士, 孙剑秋, 张耀伟. 大白菜软腐病的研究现状. 北方园艺 (*Northern Horticulture*) 2005, 25(3): 59-60.
- [5] Perombelon MCM, Kelman A. Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Ann. Rev. Phytopathology*, 1980, 18: 361-387.
- [6] 刘宜生. 中国大白菜. 北京:中国农业出版社, 1998.
- [7] 藏威, 张耀伟, 孙剑秋, 崔崇士. 大白菜软腐菌种群组成及优势菌致病型的研究. 植物资源与环境学报 (*Journal of Plant Resources and Environment*) 2006, 15(1): 26-29.
- [8] Buddenhagen IW. The relation of plant-pathogenic bacteria to the soil. Baker KF, Snyder WC. *Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens*. Berkeley: Univ Calif. Press, 1965, 269-284.
- [9] Singh US, Kohmoto K. Pathogenesis and host specificity in plant pathogenic prokaryotes. Singh US, Kohmoto K, Singh RP. *Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases*. UK: Pergamon, 1994, 1: 98-126.
- [10] 张光明, 王翠花. 大白菜抗软腐病接种鉴定方法的初步研究. 山东农业科学 (*Shandong Agricultural Sciences*). 1995, 43(5): 39-40.
- [11] Dieffenbach W, Dveksler SC. PCR 技术实验指南. 黄培堂, 等译. 北京:科学出版社, 1998.
- [12] Cuppels D, Kelman A. Evaluation of selective media for isolation of soft rot bacteria from soil and plant and tissue. *Phytopathology*, 1974, 64 (1): 468-475.
- [13] Perombelon MCM, Burnett EM. Two modified crystal violet pectate (CVP) media for the detection, isolation and enumeration of soft rot erwinias. *Potato Research*, 1991, 34: 79-85.
- [14] Cantore PLo, Iacobellis NS. Head rot of Cauliflower Caused by *Pseudomonas fluorescens* in Southern Italy. // Fatmi MB, Collmer A, Iacobellis NS, Mansfield JW, Murillo J, Schaad NW, Ullrich M. *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens. Springer, 2008, 2: 69-72.

Correlation of bacterial diversity in rot Chinese cabbage with the habitat

Xun Du¹, Yiliang Hu¹, Weihong He², Guocan Chen¹, Tengfei Wang¹, Yuchen Qiu³, Yanan Wang^{1, 2*}

¹Key Laboratory of Microbial Engineering at the Institute of Biology, ²Henan Microbiological Culture Collection Center, Henan Academy of Sciences, Zhengzhou 450008, China

³School of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China

Abstract: [Objective] To investigate the diversity of bacteria in soft rot Chinese cabbage and analyze their correlation with rhizosphere bacteria, we analyzed the bacterial population structures of soft rot Chinese cabbage and the rhizosphere in different habitat. [Methods] Based on the initial medium and artificial Chinese cabbage medium, we isolated the bacteria from soft rot tissues and rhizospheric soils from two typical habitats. According to the analysis of 16S rRNA gene sequence homology, we identified the isolated strains and analyzed the strains population structure. [Results] The total bacteria in soft rot tissues were 4.0×10^8 cell g^{-1} and 1.2×10^{11} cell g^{-1} , the number of pure strains were 56 and 85, the dominant strains were *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* and *Pseudomonas* spp. (*P. hibiscicola*, *P. taiwanensis*, *P. tuomuerensis*, *P. mosselii*). The total bacteria in rhizospheric soils were 2.7×10^5 cell g^{-1} and 6.2×10^7 cell g^{-1} , the number of pure strains were 36 and 70, the dominant strains were *Bacillus megatherium* and *Pseudomonas* spp. (*P. plecoglossicida*, *P. hibiscicola*, *P. parafulva*, *P. monteilii*, *P. geniculata*). [Conclusion] The methods used in this study were effective in analyzing bacterial diversity in soft rot Chinese cabbage and the results correlated well with the soil bacteria analysis, suggesting that soft rot Chinese cabbage may be induced by various environmental bacteria. Our results infer that soft rot of Chinese cabbage might be pathogen-complex, and provide the clues for the mechanism study and protection.

Keywords: Soft rot Chinese cabbage, rhizospheric soils, 16S rRNA gene sequence

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Laboratory Projects (MELRS0940).

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-371-63382181; E-mail: wangyanan@mail.tsinghua.edu.cn

Received: 24 June 2011 / Revised: 15 August 2011