

浙江省蝴蝶兰细菌性软腐病病原鉴定

吴志毅¹, 方媛², 陈曦¹, 张慧丽³, 张明哲¹, 李斌²

(1. 浙江省检验检疫科学技术研究院, 浙江 杭州 310012; 2. 浙江大学生物技术研究所 农业部作物病虫分子生物学重点开放实验室, 浙江 杭州 310029; 3. 宁波出入境检验检疫局, 浙江 宁波 315012)

摘要: 对浙江杭州地区近年来新发生的蝴蝶兰 *Phalaenopsis* 软腐病病原细菌进行了分离、致病性测定、Biolog 测定和脂肪酸甲基酯(FAME)脂肪酸测定, 16 S 序列分析。结果表明, 该菌与菊欧文氏菌 *Erwinia chrysanthemi* 性状、特征完全相同, 在序列分析中能以较高的自举置信值与菊欧文氏菌标准菌株聚在一起。因此, 可以确定, 引起杭州地区蝴蝶兰细菌性软腐病的病原菌是菊欧文氏菌。图 1 表 2 参 10

关键词: 植物保护学; 蝴蝶兰; 细菌性软腐; 病原鉴定; 菊欧文氏菌

中图分类号: S432 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2010)04-0635-05

Pathogen identification of bacterial soft rot in moth orchid in Zhejiang Province

WU Zhi-yi¹, FANG Yuan², CHEN Xi¹, ZHANG Hui-li³, ZHANG Ming-zhe¹, LI Bin²

(1. Zhejiang Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Hangzhou 310012, Zhejiang, China; 2. Key Laboratory of Molecular Biology of Crop Pathogens and Insects of Ministry of Agriculture, Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang, China; 3. Ningbo Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Ningbo 315012, Zhejiang, China)

Abstract: A causal agent of bacterial soft rot in moth orchid was isolated and identified which occurred in Hangzhou, Zhejiang Province in recent years. The pathogenicity test, Biolog test and fatty acid methyl esters (FAME) test were undertaken to elucidate the precise position of the causal bacterium. The results indicated that the causal agent's characteristics were same to *Erwinia chrysanthemi*. And, 16S rRNA gene sequence analysis also showed that the pathogenic bacterium was closely related to *E. chrysanthemi* and well separated from all other *Erwinia* species. Therefore, it could be concluded that the pathogenic bacterium causing bacterial soft rot of moth orchid was identified as *E. chrysanthemi*. [Ch, 1 fig, 2 tab, 10 ref.]

Key words: plant protection; moth orchid; bacterial soft rot; identification; *Erwinia chrysanthemi*

蝴蝶兰 *Phalaenopsis* 细菌性软腐病是国内外蝴蝶兰生产上的一大障碍, 病原学研究进一步显示假单胞菌 *Pseudomonas* sp.^[1], 菊欧文氏菌 *Erwinia chrysanthemi*^[2] 和大白菜软腐病菌 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*^[3] 都能引起该病害的发生。2007 年上半年, 在浙江省杭州市浙江大学华家池校区花卉苗圃栽培的蝴蝶兰上出现的细菌病害, 初期主要危害叶片, 不论新叶或老叶都会发生, 叶片感染后出现水浸状斑点, 随即迅速扩大, 感病部位内部组织被细菌分解成液体状态, 叶片失去支撑力而下垂。水浸状病斑处颜色较深, 与浅绿色健康组织有明显区别。腐烂处发出臭气, 然后病部组织崩溃, 内物流出, 病叶呈纸状干枯。高温、高湿、不通风的环境容易诱发该病的发生。病部切片在低倍显微镜

收稿日期: 2009-09-24; 修回日期: 2009-12-01

基金项目: 国家科技部科学技术基础性专项(2006FY111000); 中央高校基本科研业务费专项资金资助

作者简介: 吴志毅, 农艺师, 博士, 从事植物检疫和分子生物学研究。E-mail: wzy@ziq.gov.cn。通信作者: 李斌, 副教授, 从事植物病原细菌研究。E-mail: libin0571@zju.edu.cn

下均能观察到喷菌现象。为明确浙江省蝴蝶兰细菌性软腐病到底是由哪一种病菌引起,为蝴蝶兰病害的有效治理提供切实可行的依据,笔者对该病开展了病原鉴定研究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标准菌株与病原细菌分离

菊欧文氏菌标准菌株, *Erwinia chrysanthemi* ATCC11662 和 SCH-1 分别由上海市出入境检验检疫局和浙江大学生物技术研究所提供。其他参考标准菌株 *Xanthomonas axonopodis* pv. *poinsetticola* LMG 849 和 LMG5401 以及 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* LMG5570 和 LMG2231 均由比利时根特大学国家菌种保藏中心提供。首先,镜检样本上是否有其他可见病原物,然后取无真菌菌丝或孢子的典型病株样本 3 份。病部叶表经体积分数为 70%乙醇消毒后,在肉汁胨培养基(NA)上划线分离,平板在 28 °C 下培养 3 d 后于挑取代表菌落进行进一步测试。

1.2 病原的常规细菌学及 Koch 假说测定

菌落形态、培养性状、烟草过敏性反应及 Koch 假说测定按 Klement 等^[4]方法;生理生化测定按 Schaad 等^[5]方法。离体致病性测定参照 Yessad 等^[6]的方法进行。Koch 氏病原假说测定的蝴蝶兰品种为“火鸟”,将所测菌株浓度调节到 1011 个·L⁻¹,采用针刺法在蝴蝶兰的叶片上接种,5 d 后开始记录发病情况。接种后放置 28 °C 的人工气候箱内培养。

1.3 病原的 Biolog 鉴定

选取 3 株有代表性的菌株,分别命名为 H-1, H-2 和 H-3,用 Biolog 进行证实,在含 95 个碳源的 Biolog 阴性(GN)微孔板中,加入 150 mL·孔⁻¹ 所测细菌悬浮液(吸光度值 0.3)。在 30 °C 下培养 24 h 后由 Biolog 读数机测得反应结果,并直接进入 Biolog 专用细菌鉴定程序(4.1 版本)。具体操作参照文献[7-8]的方法。

1.4 病原的脂肪酸甲基酯(FAME)鉴定

FAME 鉴定采用 Agilent 6890 型气相色谱系统。参照 MIDI 公司说明书及文献[7-8]的方法进行。所有纯化的参试菌株先在 NA 培养基上于 30 °C 生长 24 h 后,转入 TSBA 固体培养基上再培养 24 h。然后用无菌塑料接种环挑取 1 环培养菌放入有螺帽的试管中,提取脂肪酸。鉴定结果通过微生物鉴定系统软件——MIDI 公司开发的基于细菌细胞脂肪酸成分鉴定细菌的 MIS 4.5 (microbial identification system)和 LGS 4.5(library generation software)获得。把结果与数据库中标准菌种的脂肪酸信息进行比对。

1.5 16S 基因序列分析

根据已发表^[9]的植物病原细菌 16S 的通用引物对分离的致病细菌进行聚合酶链式反应(PCR)扩增,正反向引物分别为: P1 (5'-GTTACCGACAGAATAAGCACCC-3') 和 P2 (5'-CCTACGGCTACCTTGT TACGAC-3')。扩增反应体积 20.0 μL; DNA 模板 1.0 μL; P1(10.0 μmol·L⁻¹)0.5 μL; P2(10.0 μmol·L⁻¹)0.5 μL; 2 × Taq PCR StarMix 10.0 μL, 双蒸水补足至 20.0 μL。反应条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 25 s, 65 °C 退火 25 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min; 最后 4 °C 保存。PCR 反应在 PTC-200 型热循环仪上进行,取 5.0 μL 反应液在 10.0 g·kg⁻¹ 琼脂糖凝胶上进行电泳检测,得到 1.5 kb 左右大小的条带。将 PCR 产物送华大生物技术责任公司克隆并测序。将得到的测序结果在 GenBank(登录 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行 blast 比对。

1.6 16S 基因聚类分析

以测序得到的 3 条 16S 序列为材料,利用 ClustalX 软件将测得的 16S 序列与已报道的菊欧文氏菌和相近属种的 18 条 16S 序列进行序列对齐和同源性序列的多重排定,MEGA 3.1 构建分子系统树。根据 Kimura 双参数模型计算遗传距离,相应的标准误差用 Bootstrap 方法(replications = 1 000), NJ, MP, ME 和 UPGMA 系统树通过 MEGA 3.1 软件得出,系统树中节点的自举置信水平(bootstrap confidence level, BCL)应用自引导(bootstrap)估计,共 1 000 次循环。

2 结果与分析

2.1 病原的细菌学特征

来自不同样品的 3 株蝴蝶兰分离菌株的革兰氏染色反应均为阴性，菌体杆状，具周生鞭毛 3 ~ 8 根，能游动，兼性厌氧，不产生芽孢。在 NA 培养基上于 28 °C 生长 3 d，菌落乳白色，扁平，褶皱有光泽，大小 0.5 ~ 1.0 μm × 1.0 ~ 3.0 μm。在 KMB(Kings Medium B Agar) 培养基上不产生荧光色素。它们与菊欧文氏菌标准菌株 *Erwinia chrysanthemi* ATCC11662 和 SCH-1 的反应基本一致。

2.2 致病性测定

将 3 株蝴蝶兰软腐病分离细菌与 2 株菊欧文氏菌标准菌株 *E. chrysanthemi* ATCC11662 和 SCH-1 的菌液浓度调至 1 011 个·L⁻¹ 的菌悬液接种烟草 *Nicotiana tabacum*，观察其过敏性反应。结果发现，所有菌株在接种后 24 h 后均产生明显的过敏性反应，呈灰色晕圈，而无菌水对照无过敏性反应。Koch 氏测定表明，在接种后的第 3 ~ 4 天，蝴蝶兰叶片发病，病状为水渍状病斑，呈半透明状，组织软腐，有恶臭味。从接种发病的病叶上分离获得同样病原。

2.3 Biolog 鉴定

2 个标准菊欧文氏菌菌株的 Biolog 鉴定结果与原鉴定完全一致，其相似性分别为 0.85 和 0.76。3 株蝴蝶兰分离菌代表菌株的 Biolog 测定结果显示，它们均被鉴定为 *Erwinia chrysanthemi*，Biolog 相似性在 0.77 ~ 0.82，接近或超过标准菌株，具有很高的可信度(表 1)。

表 1 3 株蝴蝶兰软腐病细菌与标准菌株的 Biolog 鉴定结果
Table 1 Biolog identity of 3 soft rot bacteria of moth orchid and standard reference strains

菌株	原鉴定结果	Biolog 当前鉴定结果	
		相似度	鉴定结果
ATCC11662	菊欧文氏菌 <i>Erwinia chrysanthemi</i>	0.851	菊欧文氏菌 <i>Erwinia chrysanthemi</i>
SCH-01	菊欧文氏菌 <i>Erwinia chrysanthemi</i>	0.760	菊欧文氏菌 <i>Erwinia chrysanthemi</i>
LMG5570	丁香假单胞丁香致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0.880	丁香假单胞丁香治病种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
LMG2231	丁香假单胞丁香致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0.665	丁香假单胞丁香治病种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
LMG849	地毯草黄单胞菌一品红致病变种 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>poinsettiicola</i>	0.774	地毯草黄单胞菌 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>poinsettiicola</i>
LMG5401	地毯草黄单胞菌一品红致病变种 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>poinsettiicola</i>	0.752	地毯草黄单胞菌 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>poinsettiicola</i>
H-1		0.820	菊欧文氏菌 <i>Erwinia chrysanthemi</i>
H-2		0.801	菊欧文氏菌 <i>Erwinia chrysanthemi</i>
H-3		0.771	菊欧文氏菌 <i>Erwinia chrysanthemi</i>

2.4 病原菌的脂肪酸甲基酯 (FAME) 鉴定结果

FAME 鉴定结果匹配程度遵循 Buyer 等的原则：相似性系数 < 0.2，结果不可用；相似性系数 ≥ 0.5，鉴定到种。6 个标准菌株和 3 株蝴蝶兰软腐病细菌的 FAME 鉴定结果与 Biolog 鉴定完全一致(表 2)，其中 2 株 *Erwinia chrysanthemi* 标准菌株的 FAME 相似度在 0.84 和 0.79，3 株蝴蝶兰软腐病细菌的 FAME 相似度在 0.67 ~ 0.75，均接近或超过标准菌，表明本次 FAME 鉴定结果真实可靠。

2.5 病原菌的 16S 序列分析

登录 GenBank 进行序列比较，结果表明，3 株检测菌株与 *E. chrysanthemi*，*Dickeya dadantii* 的同源性均高达 99%。但根据上述的细菌学特征、Biolog 和 FAME 分析鉴定及其在蝴蝶兰上的致病性测定(后一种病原在蝴蝶兰上不致病)，可以排除后一种病原细菌的可能性。

表2 3株蝴蝶兰软腐病细菌与标准菌株的脂肪酸鉴定结果

Table 2 FAME identity of 3 soft rot bacteria of moth orchid and standard reference strains

菌株	原鉴定结果	FAME 当前鉴定结果	
		相似度	鉴定结果
ATCC11662	菊欧文氏菌 <i>Erwinia chrysanthemi</i>	0.851	菊欧文氏菌 <i>Erwinia chrysanthemi</i>
SCH-01	菊欧文氏菌 <i>Erwinia chrysanthemi</i>	0.760	菊欧文氏菌 <i>Erwinia chrysanthemi</i>
LMG5570	丁香假单胞丁香致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0.582	丁香假单胞丁香治病种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
LMG2231	丁香假单胞丁香致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	0.670	丁香假单胞丁香治病种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
LMG849	地毯草黄单胞菌一品红致病变种 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>poinsetticola</i>	0.605	地毯草黄单胞菌一品红致病变种 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>poinsetticola</i>
LMG5401	地毯草黄单胞菌一品红致病变种 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>poinsetticola</i>	0.626	地毯草黄单胞菌一品红致病变种 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>poinsetticola</i>
H-1		0.666	菊欧文氏菌 <i>Erwinia chrysanthemi</i>
H-2		0.751	菊欧文氏菌 <i>Erwinia chrysanthemi</i>
H-3		0.680	菊欧文氏菌 <i>Erwinia chrysanthemi</i>

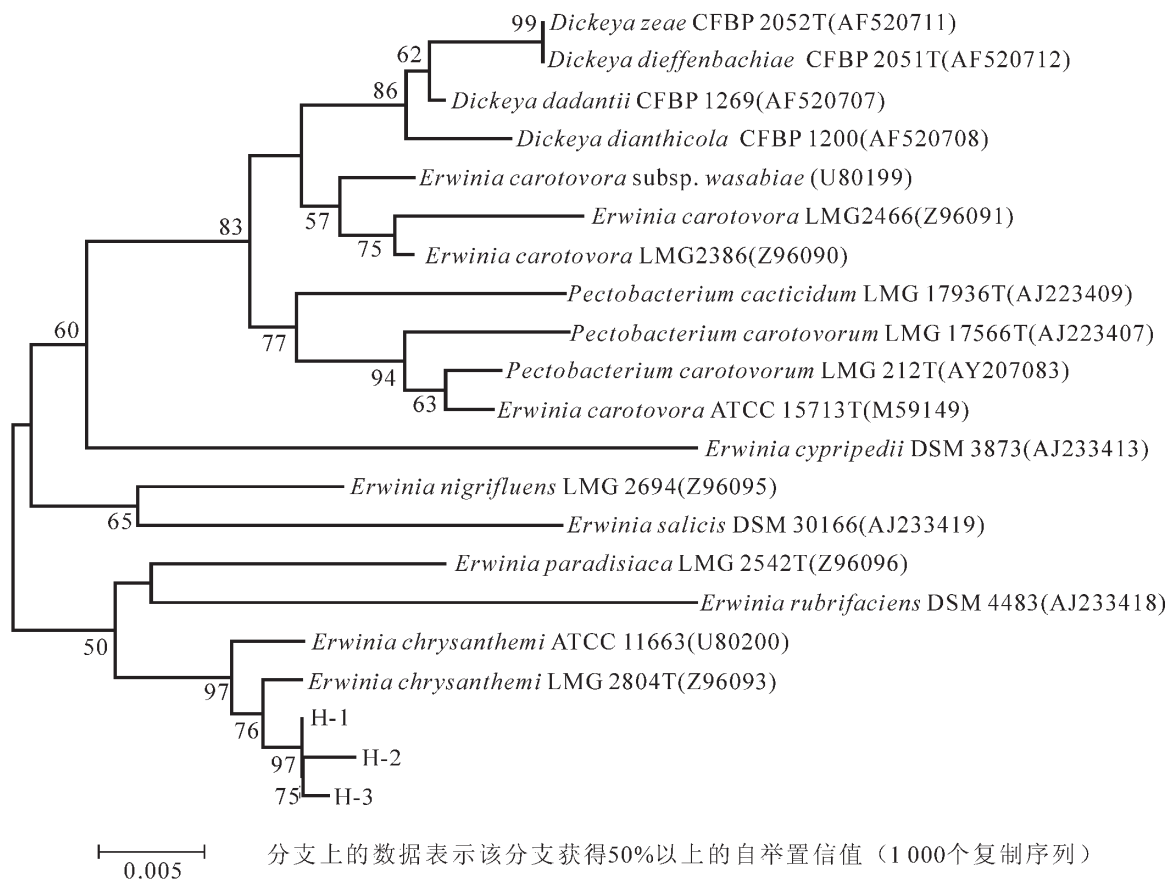


图1 蝴蝶兰细菌性软腐病菌与相近种的16S基因分子系统树

Figure 1 Phylogenetic tree derived from the 16S rDNA gene sequences analysis between soft rot bacteria of moth orchid and related species

2.6 16S基因的聚类分析

根据 Kimura 双参数模型, 用 NJ 法构建的的 16S rDNA 基因的分子系统树(图 1)。图 1 表明, 3株检测菌株的 16S 序列与 *Erwinia chrysanthemi* 标准菌株以较高的自举置信值聚在一起, 而与其他属种分离开来。充分说明本研究中引起蝴蝶兰软腐的病原菌是 *E. chrysanthemi*, 并证实了前面的实验结果。

3 讨论

经过对来自不同蝴蝶兰植物样品的 3 个分离菌株的主要细菌学特性、菌落形态、致病性、Biolog、FAME 鉴定, 16S 序列分析及与 2 个标准菌株的比较, 证实了在杭州市出现的蝴蝶兰软腐是由 *E. chrysanthemi* 引起的。本研究未发现蝴蝶兰植物样品中有其他病原细菌的存在。

由于 *Pseudomonas* sp., *Erwinia carotovora* sp. *carotovora* 和 *E. chrysanthemi* 都已经被报道能引起蝴蝶兰软腐病的发生, 在植物上表现的症状也比较相似。此时, 全面了解这 3 种病菌特别是后 2 种病菌在菌落形态上的区别, 对于及时准确地识别到底是哪一种病菌引起的蝴蝶兰软腐病非常必要。*E. carotovora* sp. *carotovora* 病菌在大多数培养基上的菌落是淡灰白色至乳酪色, 光滑、圆形, 有光泽, 轻微隆起, 在 24 h 后出现肉眼可见菌落。*E. chrysanthemi* 病菌虽然在大多数培养基上的菌落也呈淡灰白色至乳酪色, 光滑、圆形, 但边缘渐变成波状至羽毛状, 较扁平或轻微隆起, 在马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 上 3 ~ 6 d 后, 菌落似“煎鸡蛋”状, 中央突起并有波状边缘; 另外在葡萄糖碳酸钙 (YDC) 培养基上培养 5 ~ 10 d 后很多菌株产生深蓝色非水溶性色素。

3 株蝴蝶兰分离菌株和 2 个对照菌株的 Biolog 图谱和 FAME 脂肪酸图谱都和数据库中的 *Erwinia chrysanthemi* 病菌显示了非常高的相似性, 显示了这 2 种技术都可以应用于浙江蝴蝶兰细菌性软腐病菌的鉴定研究。同时, 浙江蝴蝶兰细菌性软腐病菌与相近种的分子系统发育树显示 *E. chrysanthemi* 与 *E. carotovora* sp. *carotovora* 病菌在 16S 序列上差异明显, 这为分别设计特异性引物检测这 2 种病原细菌提供了可能。此外, Li 等^[10]报道了 *Erwinia chrysanthemi* 病菌引起杭州地区石斛兰 *Dendrobium* 的茎腐病, 然而笔者的研究则是第 1 次发现该病菌引起浙江地区蝴蝶兰的软腐病, 究竟从不同寄主如石斛兰和蝴蝶兰上分离的病菌间是否存在遗传多样性, 仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 李艳梅, 陈超, 李小六, 等. 引起蝴蝶兰软腐病的病原菌菌株的分离鉴定[J]. 北京农学院学报, 2004, **19** (4): 40 - 42.
LI Yanmei, CHEN Chao, LI Xiaoliu, *et al.* A new strain of pathogen isolated from soft-rotting of *Phalaenopsis* [J]. *J Beijing Agric Coll*, 2004, **19** (4): 40 - 42.
- [2] 林汉锐, 钟融融. 蝴蝶兰病害防治[J]. 广东园艺, 2003, **4** (1): 46 - 47.
LIN Hanrui, ZHONG Rongrong. Disease control of *Phalaenopsis* [J]. *Guangdong Hortic*, 2003, **4** (1): 46 - 47.
- [3] 徐建新, 丁峰, 孙莉, 等. 蝴蝶兰细菌性软腐病的发生与防治[J]. 江苏农业科学, 2006 (4): 65.
XU Jianxin, DING Feng, SUN Li, *et al.* Incidence and control of bacterial soft rot of *Phalaenopsis* [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2006 (4): 65.
- [4] KLEMENT Z, RUDOLPH K, SANDS D C. *Methods in Phytobacteriology* [M]. Budapest: Akademiai Kiado, 1990.
- [5] SCHAAD N W, JONES J B, CHUN W. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* [M]. 3rd Ed. Minnesota: American Phytopathological Society, 2001.
- [6] YESSAD S, MAUCEAN C AND LUISETTI J. A detached leaf assay to evaluate virulence and pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on pear [J]. *Plant Dis*, 1992, **76**: 370 - 373.
- [7] 苏婷, 龙那葩, 罗士波, 等. 浙江省红掌细菌性疫病病原鉴定[J]. 浙江林业科技, 2008, **28** (6): 40 - 42.
SU Ting, RUNGNAPHA K, LUO Shibo, *et al.* Identification of pathogenic bacteria of new bacterial disease damaged to *Anthurium andraeanum* in Zhejiang Province [J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 2008, **28** (6): 40 - 42.
- [8] 徐丽慧, 徐福寿, 李芳, 等. 桑细菌性青枯病病原及其生化型鉴定[J]. 植物保护学报, 2007, **34** (2): 141 - 146.
XU Lihui, XU Fushou, LI Fang, *et al.* Identification of the causal organism of bacterial wilt of mulberry and its biovars [J]. *Acta Phyto Sin*, 2007, **34** (2): 141 - 146.
- [9] LI B, XIE G L, ZHANG J Z, *et al.* Identification of the bacterial leaf spot pathogen of poinsettia in China [J]. *J Phytopathol*, 2006, **151**: 711 - 715.
- [10] LI B, QIU W, FANG Y, *et al.* Bacterial stem rot of oncidium orchid caused by a *Dickeya* sp. (ex *Pectobacterium chrysanthemi*) in mainland China [J]. *Plant Dis*, 2009, **93** (5): 552.