广西香蕉细菌性软腐病病原鉴定及生物学特性研究

杜婵娟[1]， 杨 迪[1]， 付 岗[1*]， 叶云峰[2]， 潘连富[1]， 张 晋[1]

（1. 广西农业科学院植物保护研究所，广西作物病虫害生物学重点实验室，南宁 530007；
2. 广西农业科学院园艺研究所，南宁 530007）

摘要 为明确引起广西香蕉细菌性软腐病的病原，采用组织分离法从染病的香蕉组织中分离病原菌，通过柯赫氏法则验证其致病性。对病原菌进行形态学观察、分子鉴定、生理生化测试及生物学特性测定。结果表明，从染病蕉头和蕉果分离到的病原菌，其菌株的形态特征、生理生化测试结果与 *Dickeya* sp. 基本一致，16S rDNA 基因序列与 *Dickeya* 属细菌的同源性达 99%；其最适培养温度为 28℃，最适 pH 为 7.0。病原菌的 *dnaX*、*gryB* 和 *recA* 基因序列与 *D. zeae* 的同源性均在 97%以上。多基因系统发育树显示，病原菌与所有的 *D. zeae* 细菌聚在同一个最小进化分支里，自展支持率为 100%。根据以上结果，将引起广西香蕉细菌性软腐病的病原菌鉴定为 *Dickeya zeae*。同时，测定 7 种杀菌剂对 GR-1 菌株的室内毒力，46%氢氧化铜 WG 的 EC_{50} 最低，为 186.69 mg/L；其 500 倍稀释液对 GR-1 菌株的抑菌效果最好，达 76.89%。

关键词 香蕉； *Dickeya zeae*； 病原鉴定； 多基因系统发育； 生物学特性

中图分类号： S 436.681 **文献标识码**： A **DOI**： 10.16688/j.zwbh.2018413

Identification and biological characteristics of the pathogen causing banana bacterial soft rot disease in Guangxi

DU Chanjuan[1]， YANG Di[1]， FU Gang[1]， YE Yunfeng[2]， PAN Lianfu[1]， ZHANG Jin[1]

（1. *Plant Protection Research Institute*, *Guangxi Key Laboratory for Biology of Crop Diseases and Insect Pests*, *Guangxi Academy of Agricultural Sciences*, *Nanning* 530007, *China*；
2. *Institute of Horticulture*, *Guangxi Academy of Agricultural Sciences*, *Nanning* 530007, *China*）

Abstract In order to clarify the pathogen causing banana bacterial soft rot in Guangxi, the pathogenic bacteria were isolated by tissue separation method from tissues of diseased banana, and their pathogenicity were verified through Koch's Rule. The pathogen was identified based on morphology, physiological and biochemical characteristics, molecular identification and biological characteristics. The results showed that the pathogenic bacteria were isolated from the pseudostem and fruit of diseased bananas. Their morphological characteristics, physiological and biochemical results were basically consistent with *Dickeya* sp., and the 16S rDNA gene sequences shared 99% similarity with that of *Dickeya* sp.. The optimum temperature for the pathogenic bacterium was 28℃, and the optimum pH was 7.0. The homology of *dnaX*, *gryB* and *recA* gene sequences between the pathogenic bacterium and *D. zeae* was more than 97%. Multiple-gene phylogenetic analyses indicated that the pathogen and all the bacteria of *D. zeae* clustered in the same evolutionary branch, with a self-supporting rate of 100%. According to these results, the pathogen causing banana bacterial soft rot in Guangxi was identified as *Dickeya zeae*. Furthermore, the toxicity of 7 types of bactericides against strain GR-1 were tested. The EC_{50} of copper hydroxide 46% WG was the lowest among the tested bactericides (186.69 mg/L), and its 500 times dilution had the best inhibition effect on GR-1 strain, up to 76.89%.

Key words banana； *Dickeya zeae*； pathogen identification； multiple-gene phylogeny； biological characteristics

香蕉是我国南亚热带地区的特色作物，也是广西重要的经济作物。2016 年起，陆续在广西玉林、北海等市县的蕉园发现一种新型病害，可侵染'金粉'、'广粉'和'威廉斯'等香蕉主栽品种，主要危害

收稿日期： 2018-09-24 **修订日期**： 2019-03-04
基金项目： 国家自然科学基金(31560006)；广西自然科学基金(2016GXNSFBA380173，2017GXNSFDA198002)；广西农业科学院科技发展基金(桂农科 2018JZ12，2018YM24，2018YT15)
* 通信作者 E-mail：fug110@gxaas.net

香蕉球茎和生长点,导致假茎软腐发臭,叶片发黄,严重时整株倒伏和死亡。此外,该病害在田间亦可感染蕉果,导致果实由内而外变褐腐烂,造成蕉果发育缓慢,果指细小,往往其果皮颜色与健果无多大区别,但果肉内已发生明显褐变或腐烂。该病害在香蕉苗期至成株期均可发生,并呈逐渐上升的趋势,部分蕉园发病率达 20%,病死率达 70%。高温多雨、地表温度高和田间排水不畅造成园间积水等会加速该病害的发生和流行。国内外已报道的危害香蕉假茎的病害有:由尖孢镰刀菌古巴专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* 引起的香蕉枯萎病、由青枯菌 *Ralstonia solanacearum* 引起的香蕉细菌性枯萎病、由菊欧文氏菌 *Erwinia chrysanthemi* 引起的香蕉细菌性软腐病、由黄瓜花叶病毒香蕉株系 *Cucumber mosaic virus* banana strain 引起的香蕉花叶心腐病、由香蕉束顶病毒 *Banana bunchy top virus* (BBTV)引起的香蕉束顶病等;危害蕉果的病害有:由芭蕉炭疽菌 *Colletotrichum musae* 引起的香蕉炭疽病、由轮纹镰孢 *Fusarium concentricum* 引起的香蕉冠腐病、由香蕉大茎点霉 *Macrophoma musae* 引起的香蕉黑星病以及由可可轮枝孢 *Verticillium theobromae* 引起的香蕉烟头病等[1-5]。然而,目前对广西田间发生的既危害香蕉植株,同时又危害香蕉果实的这种新病害,在国内尚未见相关报道,也不明确其病原菌的分类地位。因此,对该病害的病原菌进行鉴定与分类,是有效防治该病害的基本前提。为明确该病害的病原,本研究通过对染病的香蕉假茎和蕉果进行组织分离,以柯赫氏法则验证病原的致病性,并对其进行形态学观察、分子生物学鉴定、生理生化测试及生物学特性测定,以期为该病害的有效防治提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　培养基和供试药剂

NA 培养基:NaCl 5 g、牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、琼脂 15 g、水 1 000 mL,pH 7.0～7.2;以不加琼脂为液体培养基。

供试杀菌剂:3%中生菌素可湿性粉剂(青岛农博士生物科技有限公司)、46%氢氧化铜水分散粒剂(美国杜邦公司)、80%代森锰锌可湿性粉剂(陶氏益农农业科学有限公司)、1.6%噻霉酮涂抹剂(陕西西大华特科技实业有限公司)、18%松脂酸铜乳油(河南世诚科技有限公司)、1.8%辛菌胺醋酸盐水剂(西安嘉科农化有限公司)、80%乙蒜素乳油(河南科邦化工有限公司)。

1.2　病原菌的分离与纯化

2016 年 8 月,从广西玉林市兴业县香蕉种植区采集感病香蕉的蕉头和蕉果,于病健交界处切取 1 cm^2 的组织小块,用 75%乙醇浸泡 30 s,0.1%升汞消毒 1 min,然后用无菌水冲洗 3 次,再将其放至灭菌的研钵中,加入 5 mL 无菌水并充分研磨,用灭菌接种环蘸取研磨液在 NA 平板上划线,置 28℃培养 24 h,挑取优势单菌落进行纯化。

1.3　病原菌的致病性测定

将分离纯化得到的病原菌接种至 NA 液体培养基,于 28℃,150 r/min 培养 24 h,得到浓度为 1×10^8 cfu/mL 的菌悬液,备用。蕉苗接种:取 4～5 叶期的'威廉斯 B6'香蕉健康植株,采用注射接种法,将 500 μL 菌悬液接种至蕉苗假茎下部,以无菌的 NA 液体培养基为空白对照,每处理 5 次重复。蕉果接种:采用注射接种法进行活体接种,用针刺穿果皮后,将 1 mL 菌悬液接种至香蕉果肉,以无菌的 NA 液体培养基为空白对照,每处理 5 次重复。

以上试验在广西农业科学院植物保护研究所玻璃网室进行,试验期间日平均气温 28℃,每天喷水保湿,观察并记录蕉苗及蕉果的发病情况。分别在接种后第 4 天观察蕉苗接种结果,在接种后第 10 天观察蕉果接种结果。

1.4　病原菌的鉴定

1.4.1　形态学观察

挑取病原菌至 NA 平板,28℃培养 24 h,观察菌落形态;同时对培养 20 h 的菌体进行透射电镜观察,观察菌体的大小及形态特征。

1.4.2　16S rDNA 序列分析

采用生工生物工程(上海)股份有限公司的 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒对病原菌进行总 DNA 的提取,以通用引物 27F/1492R(5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′/5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′)进行 16S rDNA 扩增。PCR 反应体系为 25 μL,包括 10×PCR Buffer 2.5 μL,$MgCl_2$(25 mmol/L)3 μL,dNTPs(10 mmol/L)1 μL,27F/1492R(10 μmol/L)各 1 μL,*Taq* 酶(5 U/μL)0.5 μL,模板 DNA 1 μL;ddH_2O 补足至 25 μL。反应程序为:94℃预变性 3 min;94℃变性

45 s,57℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,35 个循环;最后 72℃延伸 10 min,4℃保存。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳回收目标 DNA 片段后,委托上海鼎安生物科技有限公司进行测序,测序结果用 BLAST 软件在 GenBank 数据库中进行同源性比对,采用 MEGA 4.0 的 Neighbor Joining 法以相近序列构建系统发育树。

1.4.3 多基因分子鉴定

为进一步明确病原菌的分类小种,分别选择 DNA 聚合酶Ⅲ亚基基因(*dnaX*)、DNA 促旋酶基因(*gryB*)和重组酶基因(*recA*)对病原菌的总 DNA 进行扩增与测序,引物序列信息见表 1。反应体系参照 1.4.2,反应程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,54℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,35 个循环;最后 72℃延伸 5 min,4℃保存。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳回收目标 DNA 片段后,委托上海鼎安生物科技有限公司进行测序。

病原菌多基因系统发育树的构建:在 GenBank 数据库中下载同时含有 *dnaX*、*gryB* 和 *recA* 这 3 个基因序列的其他 *Dickeya* sp. 细菌的菌株序列,与测序获得的病原菌的 3 个基因,依次经过 Clustal X 软件比对且校正后,分别按照 *dnaX-gryB-recA* 的顺序首尾相连,并进行同源性分析。以果胶杆菌 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 作为外群,采用 MEGA 4.0 的 Neighbor Joining 法构建病原菌株基于 *dnaX*、*gryB* 和 *recA* 基因序列的系统发育树。

表 1 *dnaX*、*gryB* 和 *recA* 基因引物序列

Table 1 Primer sequences of *dnaX*, *gryB* and *recA* genes

基因位点 Gene locus	引物 Primer	序列(5′-3′) Sequence (5′-3′)	产物大小/bp Product size
dnaX	dnaXf	TATCTGGTYCTTGCCCGTAAGTGG	536
	dnaXr	TCGACATCCARCGCYTTGAGATG	
gryB	gryBf1	ATGTCGAATTCTTATGACTCCTC	2 412
	gryBr1	TCARATATCRATATTCGCYGCTTTC	
recA	recAf	GGTAAAGGGTCTATCATGCG	700
	recAr	CCTTCACCATACATAATTTGGA	

1.4.4 生理生化测试

病原菌的生理生化鉴定,参照《植病研究方法》[6]和《伯杰细菌鉴定手册》[7]进行。

1.5 病原菌的生物学特性测定

为进一步了解病原菌的生物学特性,以更好地对该病害进行防治,分别从温度、pH 及抗药性等方面进行研究。参照 1.3 的方法制备病原菌的菌悬液,用无菌水调整菌悬液的浓度为 1×10^8 cfu/mL,4℃保存备用。

1.5.1 温度对病原菌生长的影响

取 1 mL 病原菌的菌悬液至 100 mL NA 液体培养基,分别置于 10、13、16、19、22、25、28、31、34、37℃和 40℃,150 r/min 培养 18 h,每处理 3 次重复。于 600 nm 波长下,用紫外分光光度计测定各处理菌液的吸光值(OD)。

1.5.2 pH 对病原菌生长的影响

分别取 1 mL 病原菌的菌悬液,至 100 mL NA 液体培养基,培养基的 pH 分别为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5 和 11.0,150 r/min 培养 18 h,每处理 3 次重复;于 600 nm 波长下,用紫外分光光度计测定各处理菌液的吸光值(OD)。

1.5.3 杀菌剂对病原菌的室内毒力测定

参照严婉荣等[8]的方法,略作修改。在灭菌培养皿上距中央 2.5 cm 处对称放置 3 个灭菌牛津杯。将病原菌的菌悬液按 1%(*V*/*V*)的量加入熔化后冷却至 45℃的 NA 培养基,振荡摇匀,迅速倒入放有牛津杯的平板,凝固后取出牛津杯,形成直径 7 mm 的小孔。用无菌水对供试的 7 种药剂(表 1)进行梯度稀释,配制成 500、1 000、2 000、4 000、8 000 倍的药液,使药剂的含量分别为 2 000、1 000、500、250、125 mg/L。分别取 50 μL 不同浓度的药剂至各小孔,以无菌水为对照,每个浓度 3 次重复,28℃培养 48 h,采用十字交叉法测量抑菌圈直径,计算相对抑菌率。以药剂浓度对数值为自变量(x),相对抑菌率的几率值为因变量(y),建立毒力回归方程,计算决定系数 R^2 和抑菌有效中浓度 EC_{50}。

相对抑菌率=

$$\frac{\text{处理抑菌圈直径}-\text{对照抑菌圈直径}}{\text{处理抑菌圈直径}}\times100\%。$$

1.6 数据统计与分析

所得数据用 Excel 2016 进行汇总、平均值计算和作图,差异显著性采用 DPS 7.05 软件的 Duncan 氏新复极差法进行分析。

2 结果与分析

2.1 田间病害症状

该病害的田间症状为:首先在球茎或球茎与假茎交界处产生褐色斑点,病斑随后向周边扩展,球茎很快腐烂发臭(图 1a);假茎形成海绵状软腐,内部维

管束变褐色(图 1b);病株生长点坏死,生长迟缓,心叶萎缩或黄化,叶片逐渐变黄枯萎(图 1c)。严重时整株枯死,极易推倒或被风吹倒。该病有时也可感染果实,导致个别果实由内而外变褐腐烂(图 1d～e)。



a: 病株假茎横切面; b: 假茎软腐; c: 整株症状; d: 感病蕉果; e: 病果纵切面
a: Cross section of diseased pseudostem; b: Soft rot of pseudostem; c: Symptom of whole plant; d: Diseased banana; e: Longitudinal section of diseased banana

图 1　香蕉细菌性软腐病田间危害症状

Fig. 1　Symptoms of banana bacterial soft rot disease in the field

2.2　致病性测定

采用稀释分离法分别从染病蕉头和蕉果中分离纯化得到细菌 GR-1 菌株和 GR-2 菌株。采用注射接种法,分别将 2 个菌株接种至健康香蕉苗的假茎。接种 1 d 后,接种点出现深褐色病斑并发生腐烂,随后病斑逐渐向上蔓延至新叶,引起生长点坏死,假茎开裂及叶柄腐烂,导致叶片黄化下垂。接种 4 d 后,发病严重的蕉苗整株软腐倒伏,叶片全部死亡。而将菌株接种至香蕉果肉中,接种 10 d 后,先在接种点出现红褐色病斑,随后病斑在果肉中逐渐扩大,呈深褐色,使果皮开裂,造成果肉腐烂。以上症状均与田间症状相符(图 2)。

2.3　病原菌的形态特征

形态学观测结果表明,病原菌呈直杆状,大小(0.5～1.0) μm×(1.0～3.0) μm,革兰氏阴性,周生鞭毛运动,不形成芽胞(图 3a);其在 NA 平板上生长,菌落为乳白色,略带灰色,近圆形,中间凸起,并具有波状或珊瑚状的边缘(图 3b)。

2.4　病原菌的 16S rDNA 序列分析

以通用引物 27F/1492R 对 GR-1 和 GR-2 菌株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,经电泳检测获得长度约 1 500 bp 的 DNA 片段(图 4)。回收该片段进行测序,得到长度为 1 370 bp 的 GR-1 菌株基因序列(GenBank 登录号:MF041857),以及长度为 1 348 bp 的 GR-2 菌株基因序列(GenBank 登录号:MK578204)。在 GenBank 中进行 BLAST 比对显示,与 GR-1 和 GR-2 菌株序列同源性在 99%以上的菌株均为 *Dickeya* sp.。用软件 MEGA 4.0 将 GR-1 和 GR-2 菌株与

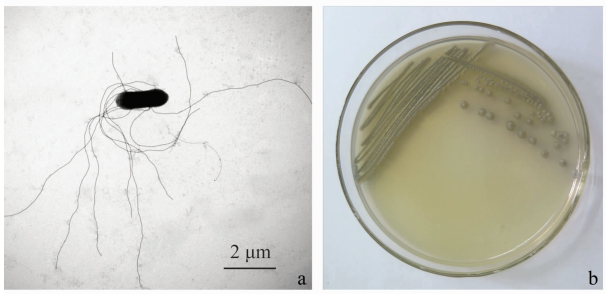
GenBank 中的 11 株临近种属的细菌一起构建基于 16S rDNA 序列的系统发育树，结果（图 5）表明，病原菌 GR-1 和 GR-2 菌株聚在同一最小分支内，自展支持率为 100%，表明它们的亲缘关系最接近。此外，病原菌 GR-1 和 GR-2 菌株与 *Dickeya* sp. 的细菌处于同一个大分支内，自展支持率为 80%，表明它们与 *Dickeya* sp. 的细菌在进化上的距离最近。因此，初步将病原菌 GR-1 和 GR-2 菌株鉴定为 *Dickeya* sp.。



a: 空白对照; b: 感病植株; c: 空白对照; d: 感病蕉果
a: Blank control; b: Diseased plant; c: Blank control; d: Diseased fruit

图 2 分离菌株 GR-2 对香蕉苗和蕉果的致病性测定

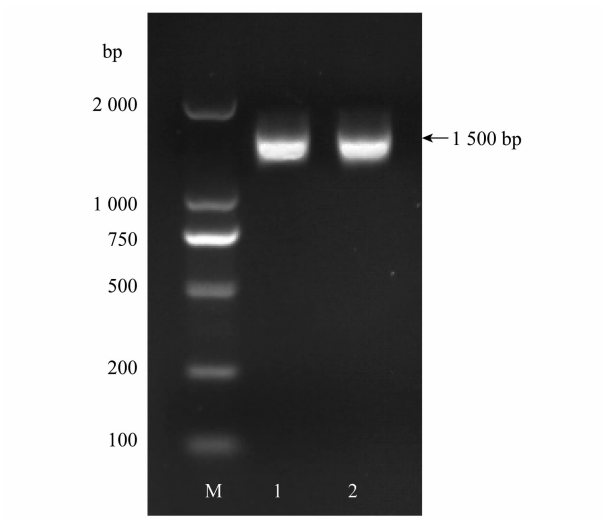
Fig. 2 Pathogenicity test of strain GR-2 on banana plant and fruit



a: 病原菌的菌体形态; b: 病原菌的菌落形态
a: Mycelial morphology of the pathogenic bacterium; b: Colony morphology of the pathogenic bacterium

图 3 香蕉细菌性软腐病病原菌的形态特征

Fig. 3 Morphological characters of the pathogen causing banana bacterial soft rot



M: Marker; 1: GR-1菌株; 2: GR-2菌株
M: Marker; 1: Strain GR-1; 2: Strain GR-2

图 4 香蕉细菌性软腐病病原菌 16S rDNA 序列的 PCR 扩增

Fig. 4 PCR analysis of the 16S rDNA sequence of the pathogen causing banana bacterial soft rot

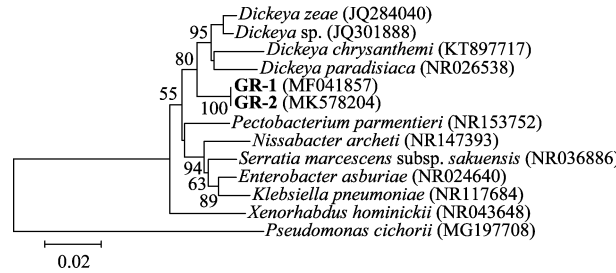
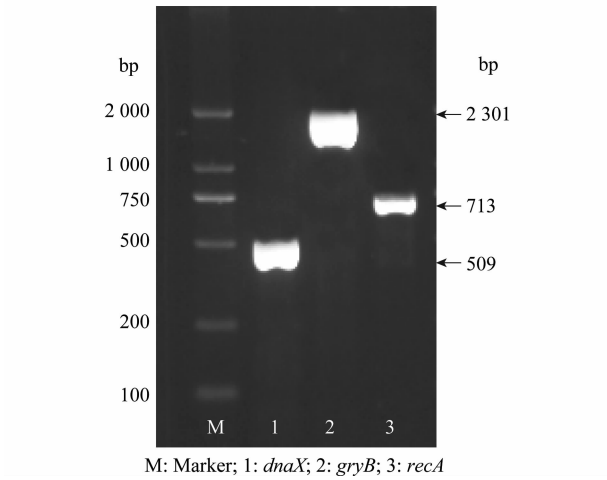


图 5 基于 16S rDNA 序列同源性的病原菌系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence homology of the pathogenic bacterium and the related bacteria derived from GenBank database

2.5 病原菌的多基因分子鉴定

对 GR-1 菌株的 *dnaX*、*gryB* 和 *recA* 基因序列进行测序，测序后分别获得长度为 509 bp 的 *dnaX* 序列（GenBank 登录号：MK566230）、长度为 2 301 bp 的 *gryB* 序列（GenBank 登录号：MK566228）和长度为 713 bp 的 *recA* 序列（GenBank 登录号：MK566229）（图 6）。在 GenBank 中进行 BLAST 比对，显示这 3 段序列与 *D. zeae* 的同源性均在 97%以上。在 GenBank 中下载 23 株同时含有 *dnaX*、*gryB* 和 *recA* 基因的 *Dickeya* sp. 菌株序列，与 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 作为外群进行分析，结果（图 7）表明，在 *dnaX-gryB-recA* 3 个保守基因构建的系统发育树中，23 株 *Dickeya* sp. 菌株分别以较高的支持率聚在 6 个不同的分支里，每一个分支都代表了对应的 *Dickeya* 小种。其中，GR-1 菌株与所有的 *D. zeae* 细菌聚在同一个最小进化分支里，且自展支持率为 100%。



M: Marker; 1: *dnaX*; 2: *gryB*; 3: *recA*

图 6　GR-1 菌株 *dnaX*、*gryB* 和 *recA* 基因序列的 PCR 扩增

Fig. 6　PCR analysis of the *dnaX*, *gryB* and *recA genes* of strain GR-1

2.6　病原菌的生理生化特征

选取菌株 GR-1 进行了生理生化特性的测试,结果表明:菌株可液化明胶,但不能水解淀粉;可分解蛋白胨生成吲哚,不能分解半胱氨酸产生 H_2S;硝酸盐还原反应和 VP 试验为阴性;不能利用苯丙氨酸;可发酵葡萄糖产酸,但不产气;能利用木糖、甘露醇、甘露糖、棉子糖、果糖、蔗糖,但不能利用乳糖、麦芽糖和山梨醇(表 2)。对照《伯杰细菌鉴定手册》[7],该菌株生理生化的测定结果与 *Dickeya* 属细菌的特征基本相符。

因此,根据形态学特征、生理生化测试和分子生物学鉴定结果,将病原菌 GR-1 鉴定为 *Dickeya zeae*。

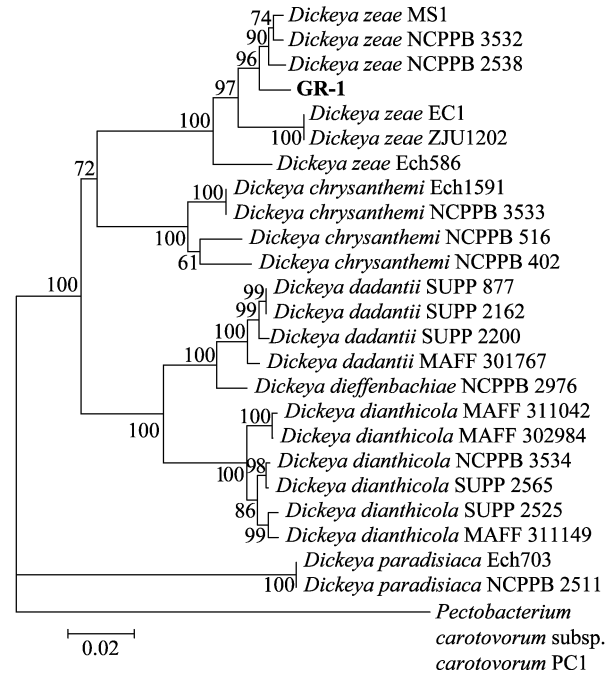


图 7　基于 *dnaX*, *gryB* 和 *recA* 基因序列的香蕉细菌性软腐病菌系统发育树

Fig. 7　Phylogenetic tree of pathogen causing banana bacterial soft rot and *Dickeya* strains based on concatenated sequences of *dnaX*, *gryB* and *recA* genes

表 2　菌株 GR-1 的生理生化反应测定结果[1)]

Table 2　Physiological and biochemical reactions of strain GR-1 causing banana bacterial soft rot

测定项目 Index	生理生化反应 Physiological and biochemical characteristic	测定项目 Index	生理生化反应 Physiological and biochemical characteristic
H_2S 产生 Production of H_2S	−	木糖 Xylose	+
甲基红 Methyl red	−	甘露醇 Mannitol	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	甘露糖 Mannose	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	−	棉子糖 Raffinose	+
VP 试验 VP reaction	−	山梨醇 Sorbitol	−
淀粉水解 Amylohydrolysis	−	果糖 Fructose	+
苯丙氨酸 Phenylalanine	−	乳糖 Lactose	−
吲哚产生 Indole production	+	麦芽糖 Maltose	−
葡萄糖 Glucose	+	蔗糖 Sucrose	+

1) +,阳性反应; −,阴性反应。
+, Positive; −, Negative.

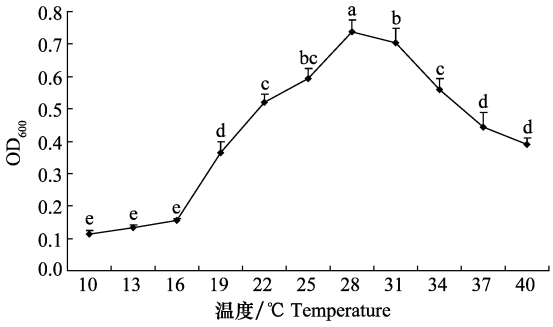
2.7　温度对 GR-1 菌株生长的影响

由图 8 可知,菌株 GR-1 在 10～40℃范围内均可生长。当温度为 28℃时,菌株 GR-1 生长最好,其 OD_{600} 为 0.737;当温度低于 16℃时,该菌株生长最差,OD_{600} 低于 0.156。

2.8　pH 对 GR-1 菌株生长的影响

GR-1 菌株在 pH 4.5～8.5 范围内生长较好,其 OD_{600} 均在 1.373 以上,并在 pH 为 7.0 时达到最大

值，OD_{600}为2.315；而pH＞9.0时，该菌株的OD_{600}则迅速下滑至0.753以下。pH＜4.0或pH＞9.5时，均不适合GR-1菌株生长(图9)。



不同小写字母代表数据在5%水平上的差异显著性。下同
The lowercases represent the significant level of difference at 5% level. The same below

图8 香蕉细菌性软腐病菌GR-1菌株在不同培养温度下的吸光值

Fig. 8 OD_{600} of strain GR-1 causing banana bacterial soft rot at different temperatures

2.9 杀菌剂对病原菌的室内毒力测试

建立了7种杀菌剂对供试菌株的毒力回归方程，计算各杀菌剂的抑菌有效中浓度EC_{50}。从表3可知，测试的7种药剂中，除18%松脂酸铜EC和80%乙蒜素EC完全没有抑菌效果以外，其他5种药剂均表现出一定的抑菌效果。各药剂的抑菌率都随着稀释浓度的升高而降低。其中，46%氢氧化铜WG的EC_{50}最低，为186.69 mg/L，其抑菌效果较好，并在稀释为500倍时的抑菌率最高，为76.89%；而1.6%噻霉酮PN的EC_{50}最高，为2 031.84 mg/L，其抑菌效果一般；而1.8%辛菌胺醋酸盐在稀释倍数高于4 000倍时，则不表现抑制作用。

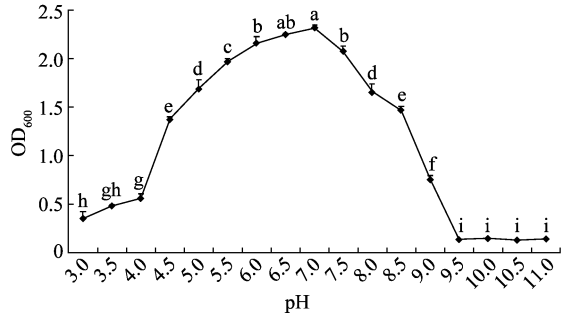


图9 香蕉细菌性软腐病菌GR-1菌株在不同pH下的吸光值

Fig. 9 OD_{600} of strain GR-1 causing banana bacterial soft rot at different pH values

表3 杀菌剂对香蕉细菌性软腐病菌GR-1菌株的室内毒力

Table 3 Toxicity of bactericides against strain GR-1 causing banana bacterial soft rot

供试药剂 Bactericide	稀释倍数 Dilution times	抑菌圈直径/cm Diameter of inhibition zone	抑菌率/% Inhibition rate	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数(R^2) Correlation coefficient	EC_{50}/mg·L^{-1}
46%氢氧化铜WG copper hydroxide 46% WG	500	2.38±0.06	76.89±0.55			
	1 000	1.75±0.04	68.60±0.63			
	2 000	1.51±0.02	63.58±0.37	y=0.711 5x+3.384 1	0.992 7	186.69
	4 000	1.19±0.04	53.78±1.51			
	8 000	0.99±0.08	44.44±4.10			
80%代森锰锌WP mancozeb 80% WP	500	1.66±0.05	66.87±0.89			
	1 000	1.52±0.02	63.82±0.48			
	2 000	1.47±0.03	62.59±0.77	y=0.796 8x+2.931 6	0.872 3	394.35
	4 000	0.93±0.11	40.86±7.97			
	8 000	0.80±0.08	31.25±6.38			
3%中生菌素WP zhongshengmycin 3% WP	500	1.41±0.04	60.99±1.02			
	1 000	1.32±0.08	58.33±2.44			
	2 000	0.99±0.09	44.44±5.62	y=0.969 5x+2.181 4	0.962 0	807.74
	4 000	0.77±0.03	28.57±2.90			
	8 000	0.70±0.02	21.43±2.07			
1.6%噻霉酮PN benziothiazolinone 1.6% PN	500	1.08±0.03	49.07±1.44			
	1 000	0.87±0.03	36.78±2.35			
	2 000	0.70±0.04	21.43±4.59	y=1.293 0x+0.722 9	0.985 0	2 031.84
	4 000	0.61±0.02	9.84±2.66			
	8 000	0.59±0.02	6.78±2.38			
1.8%辛菌胺醋酸盐AS xinjunan acetate 1.8%AS	500	1.46±0.03	62.33±0.86			
	1 000	0.62±0.03	11.29±3.66			
	2 000	0.56±0.01	1.79±1.31	—	—	—
	4 000	0.55±0.00	0.00±0.00			
	8 000	0.55±0.00	0.00±0.00			

续表 3　Table 3(Continued)

供试药剂 Bactericide	稀释倍数 Dilution times	抑菌圈直径/cm Diameter of inhibition zone	抑菌率/% Inhibition rate	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数(R^2) Correlation coefficient	EC_{50}/mg·L^{-1}
18%松脂酸铜 EC copper abietate 18% EC	500	0.55±0.00	0.00±0.00			
	1 000	0.55±0.00	0.00±0.00			
	2 000	0.55±0.00	0.00±0.00	—	—	—
	4 000	0.55±0.00	0.00±0.00			
	8 000	0.55±0.00	0.00±0.00			
80%乙蒜素 EC ethylicin 80% EC	500	0.55±0.00	0.00±0.00			
	1 000	0.55±0.00	0.00±0.00			
	2 000	0.55±0.00	0.00±0.00	—	—	—
	4 000	0.55±0.00	0.00±0.00			
	8 000	0.55±0.00	0.00±0.00			
CK	—	0.55	—	—	—	—

3　讨论

香蕉细菌性软腐病最早于 1983 年在西孟加拉地区发生[9],而哥伦比亚[10]、韩国[11]、伊朗[12]及印度南部[13]等地也有相关报道。在我国,该病害最早在广东发生[3]。2016 年在广西玉林市兴业县香蕉种植区发现细菌性软腐病,症状与 Lin 等[3]、番华彩等[14]的报道相似。CHIO 等[11]在韩国大田市大棚发现 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 和 *Pseudomonas cichorii* 可引起香蕉果实的软腐病。Lin 等[3]将香蕉软腐病菌人工接种至香蕉果实上,可引起果实腐烂。与前人报道不同的是,本研究在国内首次发现病菌可在田间自然侵染香蕉果实,导致个别蕉果由内而外变褐腐烂。结合形态学观察、分子生物学鉴定、生理生化测试及生物学特性测定的结果,本研究将发生在广西的香蕉软腐病菌鉴定为 *Dickeya zeae*。

值得注意的是,本研究将从蕉头和蕉果分离到的病原菌再分别回接至健康蕉头和蕉果,病菌均可导致两个不同部位发病。表明染病蕉果能够传播该病害。由于收获后蕉果在各地的调运销售相当频繁,极易造成该病的远距离跨区域传播。这在病害防控中应当引起足够重视。

Dickeya sp. 原名 *Pectobacterium chrysanthemi*、*Erwinia chrysanthemi*[15],可引起多种作物的软腐病,共包含 6 个致病种,分别为 *D. dadantii*、*D. dieffenbachiae*、*D. dianthicola*、*D. paradisiaca*、*D. chrysanthemi* 和 *D. zeae* [19-21]。由于 *Dickeya* sp. 每个种之间的基因差异很小,种群分类复杂,且与同科的果胶杆菌属 *Pectobacterium* sp. 在分子生物学上也非常接近。因此,仅从形态学、生理生化测试和 16S rDNA 基因序列信息进行区分获得的鉴定结果并不可靠,需要通过多个保守基因序列进行鉴定,以提高病原菌的识别率。Hu 等[22]通过 *atpD-gyrB-infB-rpoB* 4 个基因进行联合分析,将亲缘关系非常相近的 *Dickeya* sp. 不同种的菌株划分成不同的系统发育谱系,用于 *Dickeya* sp. 菌株种间的鉴定。Lin 等[3]采用 *dnaX-gryB-recA* 多基因系统发育分析方法,将形态上与 *Dickeya* 属细菌极难区分的香蕉软腐病病原菌鉴定为 *D. zeae*。本研究通过 *dnaX*、*gryB* 和 *recA* 3 个基因序列,构建了包含 24 株 *Dickeya* sp. 菌株的多基因系统发育树,结果表明,病原菌 GR-1 菌株与 6 株 *D. zeae* 序列聚在同一个进化分支,系统进化分析显示置信度达 100%;而其他同种的 *Dickeya* sp. 菌株也以非常高的相似度聚在同一进化分支。因此将病原菌 GR-1 菌株鉴定为 *D. zeae*。

测定了 7 种杀菌剂对 GR-1 菌株的抑菌效果,结果表明,46%氢氧化铜 WG、80%代森锰锌 WP、3%中生菌素 WP、1.6%噻霉酮 PN、1.8%辛菌胺醋酸盐 AS 对香蕉细菌性软腐病菌均有一定的抑菌作用。Wey 等[23]报道了代森锰锌对香蕉细菌性软腐病菌具有较好的抑制效果,与本研究结果相似。

香蕉细菌性软腐病是广西近年来发生较为严重的新型细菌性病害,其扩散速度快,危害性大,对广西香蕉的生产已构成严重威胁,使香蕉种植业面临严峻形势。目前已有相关报道证明,香蕉细菌性软腐病病原菌可侵染天南星科、景天科、仙人掌科、大戟科、百合科、苦苣苔科、石竹科、禾本科、茄科、菊科、鸢尾科、芭蕉科、十字花科、伞形科等 14 科 21 种植物[24]。因此,对香蕉细菌性软腐病的防治,除加强检验检疫外,还应积极开展抗病品种选育,加强田间水肥管理,并注意与非寄主作物轮作,以控制该病

在广西香蕉种植区蔓延。

参考文献

[1] 黄朝豪，李增平，马遥燕. 海南岛香蕉病害记述[J]. 中国南方果树，2000，29(3)：23－25.

[2] 桑利伟，郑服丛. 我国香蕉的主要病害及防治[J]. 安徽农业科学，2006，34(9)：1841－1845.

[3] LIN B R，SHEN H F，PU X M，et al. First report of a soft rot of banana in mainland China caused by a *Dickeya* sp.（*Pectobacterium chrysanthemi*）[J]. Plant Disease，2010，94(5)：640.

[4] 付岗，杜婵娟，潘连富，等. 广西香蕉病虫害种类调查初报[J]. 西南农业学报，2014，27(4)：1527－1531.

[5] 付岗，潘连富，杜婵娟，等. 2011—2013年广西香蕉病害记述[J]. 广西植保，2015，28(1)：1－5.

[6] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京：农业出版社，1979.

[7] BUCHANAN R E，GIBBONS N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京：中国科学出版社，1984.

[8] 严婉荣，肖敏，赵志祥，等. 辣椒细菌性叶斑病病原鉴定及室内药剂筛选[J]. 植物保护，2016，42(5)：205－209.

[9] CHATFOPADHYAY P K. 威胁西孟加拉香蕉栽培的细菌性软腐病[J]. 郭建辉，译. 福建热作科技，1987，41(4)：48.

[10] DICKEY R S，VICTORIA J I. Taxonomy and emended description of strains of *Erwinia* isolated from *Musa paradisiaca* Linnaeus [J]. International Journal of Systematic Bacteriology，1980，30(1)：129－134.

[11] CHIO J E，PARK J S，KANG H W. Bacterial soft rot of banana fruit caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Pseudomonas cichorii* [J]. Korean Journal of Plant Pathology，1988，3 (3)：202－206.

[12] HASSANZADEH N. Characterization of a new soft rot *Erwinia* to banana in Iran [J]. Iranian Journal of Plant Pathology，1990，26：5－6.

[13] SNEHALATHARANI A，KHAN A N. Biochemical and physiological characterisation of *Erwinia* species causing tip-over disease of banana [J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection，2010，43(11)：1072－1080.

[14] 番华彩，白亭亭，郭志祥，等. 云南香蕉细菌性软腐病病原鉴定[J]. 云南农业大学学报(自然科学)，2016，31(5)：785－790.

[15] HAUBEN L，MOORE E R B，VAUTERIN L，et al. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae* [J]. Systematic & Applied Microbiology，1998，21：384－397.

[16] ZHOU Jianuan，ZHANG Haibao，WU Jien，et al. A novel multidomain polyketide synthase is essential for zeamine antibiotics production and the virulence of *Dickeya zeae* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions，2011，24(10)：1156－1164.

[17] SLAWIAK M，VAN BECKHOVEN J R C M，SPEKSNIJDER A G C L，et al. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe [J]. European Journal of Plant Pathology，2009，125(2)：245－261.

[18] TOTH I K，VAN DER WOLF J M，SADDLER G，et al. *Dickeya* species：an emerging problem for potato production in Europe [J]. Plant Pathology，2011，60 (3)：385－399.

[19] SAMSON R，LEGENDRE J B，CHRISTEN R，et al. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi*（Burkholder *et al*.，1953）Brenner *et al*. 1973 and *Brenneria paradisiacal* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species，*Dickeya dadantii* sp. nov.，*Dickeya dianthicola* sp. nov.，*Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology，2005，55：1415－1427.

[20] MA Bing，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.

[21] NASSAR A，DARRASSE A，LEMATTRE M，et al. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *pel* genes [J]. Applied and Environmental Microbiology，1996，62(7)：2228－2235.

[22] HU Ming，LI Jieling，CHEN Ruiting，et al. *Dickeya zeae* strains isolated from rice，banana and clivia rot plants show great virulence differentials [J]. BMC Microbiology，2018，18(1)：136.

[23] WEY G C. Occurrence and chemical control of phalaenopsis soft rot caused by *Erwinia chrysanthemi* [J]. Report of the Taiwan Sugar Research Institute，1991，133：1－10.

[24] 袁月，陈雪凤，李华平，等. 香蕉细菌性软腐病菌的寄主范围及香蕉品种的抗性测定[J]. 华南农业大学学报，2013，34(1)：23－27.

（责任编辑：田 喆）