

# 一株强致病力软腐病菌鉴定与室内药剂筛选

李苗苗<sup>1,3</sup>, 伍翔<sup>4</sup>, 严准<sup>1</sup>, 吴中军<sup>2,3\*</sup>, 高春生<sup>1</sup>, 刘新宇<sup>5</sup>, 程毅<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院麻类研究所, 南方经济作物研究中心, 长沙 410205; 2. 重庆文理学院林学与生命科学学院, 重庆 402160; 3. 西南大学园艺园林学院, 重庆 400715; 4. 北京图为生物科技有限公司, 北京 100096; 5. 河北北方学院植物保护系, 张家口 075000)

**摘要** 通过对从湘西武陵山区感病萝卜分离的一株软腐病菌进行致病力测定, 结合萝卜软腐病菌的培养特性、菌体形态观察、生理生化测定及 6 个看家基因 (*gapA*, *icdA*, *pgi*, *rpoS*, *mdh*, *proA*) 的多位点序列分析 (MLSA), 结果表明, 病原细菌 Secpp 1600 属革兰氏阴性菌, 呈杆状, 致病力强, 可侵染分属 8 科 13 个属的多种经济作物; 与迪基氏菌 *Dickeya fangzhongdai* 菌株高度同源。选用 7 种药剂通过抑菌圈法对 Secpp 1600 进行了抑菌效果初步测定, 结果表明, 农用链霉素、SPP3 和 SPP4 可抑制病菌生长, 药剂间抑菌率存在显著差异, 其中, SPP4 的直接抑菌效果最好, 最小抑制浓度为 900  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**关键词** 软腐病菌; 看家基因; 迪基氏菌属; MLSA; 最小抑菌浓度

**中图分类号:** S 436.31 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018365

## Identification of a strong pathogen causing soft rot and indoor screening for bactericides

LI Miaomiao<sup>1,3</sup>, WU Xiang<sup>4</sup>, YAN Zhun<sup>1</sup>, WU Zhongjun<sup>2,3\*</sup>, GAO Chunsheng<sup>1</sup>, LIU Xinyu<sup>5</sup>, Cheng Yi<sup>1</sup>

(1. Institute of Bast Fibre Crops and Centre of Southern Economic Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410205, China; 2. College of Forestry and Life Sciences, Chongqing University of Arts and Sciences, Chongqing 402160, China; 3. College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China; 4. Beijing Tuwei Biotech Co., Ltd. Beijing 100096, China; 5. Department of Plant Protection, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

**Abstract** The pathogenicity of a pathogen isolated from the radish samples with the typical symptoms of soft rot in the Wuling Mountain in western Hunan was studied, and then the strain was identified by cultural and morphological characteristics, physicochemical tests, multilocus sequence analysis (MLSA) of 6 housekeeping genes (*gapA*, *icdA*, *pgi*, *rpoS*, *mdh*, *proA*). The results showed that the bacterial pathogen was Gram-negative, rod-shaped with strong pathogenicity of soft rot and infected various economic crops belonging to 13 genera in 8 families. The results showed that the strain shared a high similarity with *Dickeya fangzhongdai*. We determined the toxicity of 7 bactericides by the inhibition zone method. The results showed that agricultural streptomycin, SPP3 and SPP4 inhibited the growth of Secpp 1600 and there were significant differences among them in the inhibition rate. SPP4 showed the best direct antibacterial effect and the minimal inhibit concentration was 900  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Key words** soft rot pathogen; housekeeping genes; *Dickeya*; MLSA; minimal inhibit concentration

细菌性软腐病菌主要来自于欧文氏菌属 *Erwinia*、果胶杆菌属 *Pectobacterium* 和迪基氏菌属 *Dickeya*, 其中许多属于强致病性软腐细菌, *Dickeya* 在国际上被列为十大植物病原细菌之一<sup>[1]</sup>, 这些致

病菌可导致多种作物及园艺产品软腐病的发生, 其中, *Pectobacterium* 和 *Dickeya* 属可以侵染 50% 的被子植物, 寄主范围非常广泛, 比如水稻、玉米、马铃薯、甘薯、番茄和萝卜等<sup>[2-3]</sup>。当软腐病菌不引起疾

收稿日期: 2018-08-22

修订日期: 2018-09-22

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(1610242016025); 中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-2015-IBFC09); 湖南省自然科学基金项目(2017JJ3351); 湖南省重点研发计划(2016WK2030)

\* 通信作者 E-mail: wuzj1965@163.com; chengyi@caas.cn

病时,可以作为内生菌、附生菌和腐生菌生存,全世界农业区的植物、土壤、新鲜地表水、地下水和昆虫中均有发现。软腐病的发生和发展受环境因素的调节,比如温度、低氧等。

近年来,以萝卜、白菜及结球甘蓝等喜爱凉爽气候的十字花科大宗蔬菜为主的高山蔬菜因其独特的地理环境产地和优良品质而逐渐兴起,可以弥补南方地区的“伏缺”,种植面积逐年增加。但是由于连年种植和结构单一,导致近些年病害日趋严重,大大影响了高山蔬菜的产量及品质<sup>[4-5]</sup>。其中,软腐病对萝卜的危害主要发生在根茎、叶柄及叶片,多发生在其生长后期及采后贮藏期;在生长期,一般从根尖发病蔓延至整个根部软腐,呈烂泥状,然后向上蔓延致叶片变黑褐色软腐;萝卜染病部位呈烂泥状,发出难闻的恶臭。连种、雨水多、湿度大、根部开裂及地下害虫等可加重软腐病的发生。

本研究通过细菌形态观察、致病力测定、生理生化鉴定结合 MLSA-多位点序列分析鉴别了一株来自湘西高山地区的软腐病致病菌,并对该病菌进行了室内防治药剂筛选,旨在为生产中萝卜软腐病的防治提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供试菌株 Secpp 1600 从湖南湘西武陵山区高山感病萝卜分离得到。

供试药剂:6%春雷霉素可湿性粉剂(上海立邦农化有限公司),80%波尔多液可湿性粉剂(通州正大农药化工有限公司),72%农用链霉素可湿性粉剂(山东百士威农药有限公司)和以噻唑锌为主要有效成分的复配高效杀菌组合物 SPP1~SPP4(北京图为生物科技有限公司)。

### 1.2 病原菌回接与侵染试验

基于柯赫氏法则,常温无菌条件下将该菌株回接至萝卜活体中,观察发病特征。为进一步了解该菌株致病力大小与侵染范围,将该菌株依次接入白菜 *Brassica pekinensis*、结球甘蓝 *B. oleracea*、紫薯 *Ipomoea batatas*、杏鲍菇 *Pleurotus eryngii*、马铃薯 *Solanum tuberosum*、蒜(地上及地下部分) *Allium sativum*、葱 *A. fistulosum*、冬瓜 *Benincasa hispida* 等分属于 8 科 13 个属的作物植株,约 16 h 后观察症状并统计发病情况,软腐病病情分级如下:0 级,无病斑;1 级,病斑占样品体积 1/4 及以下;2 级,病斑占样品体积 1/2 及以下且大于 1/4 体积;3 级,病

斑占样品体积 3/4 及以下且大于 1/2 体积;4 级,病斑占样品体积 3/4 以上,但是并未达到全部软腐;5 级,样品全部软腐<sup>[6]</sup>。

### 1.3 病原鉴定

#### 1.3.1 菌体形态观察及生理生化鉴定

将纯化培养的菌株 Secpp 1600 划线接种于 LB 培养基,34℃ 培养过夜,观察并记录菌株生长状况及形态特征<sup>[7]</sup>。参照 Suharjo 等文献进行革兰氏染色、葡萄糖氧化发酵鉴定、在 King's B 培养基上产生荧光色素的鉴定<sup>[8]</sup>、细菌氧化酶试验<sup>[9]</sup>、酪蛋白水解<sup>[10]</sup>、硝酸还原反应、过氧化氢酶、明胶液化、卵磷脂酶活性鉴定、硫化氢的产生、利用包含甲基绿和酚酞二磷酸酯的 LB 培养基鉴定致病菌磷酸酶活性<sup>[11-12]</sup>、吡啶产生及 MR-VP 试验,利用 Ayers 等基础培养基鉴定 28 种含碳有机物是否可作为该菌株的碳源<sup>[13]</sup>,所有生理生化试验至少设置 3 次重复,并设置对照试验。

#### 1.3.2 MLSA-多位点序列分析

从本课题组已获得的 Secpp 1600 全基因组注释信息以及 NCBI 数据库中提取 *gapA*, *icdA*, *pgi*, *rpoS*, *mdh* 和 *proA* 6 个看家基因的序列信息<sup>[14]</sup>。通过 BLASTn 与 GenBank 中数据进行比对获取同源序列,或者从 ASAP 数据库获取 *Dickeya*, *Erwinia* 和 *Pectobacterium* 属相关同源序列,用 Mega X 软件进行多重比对,用 Sequence Maxtrix 软件联合各位点序列<sup>[15]</sup>,再转到 Mega X 中采用邻接法(neighbor-joining method, NJ) 构建系统发育树,利用 iTOL 在线工具制作进化树<sup>[16]</sup>,根据多位点进化树结果来分析 Secpp 1600 与同属其他菌株及其他属菌株的亲缘关系,以确定分类地位。

### 1.4 不同药剂对 Secpp 1600 的室内防效测定

Secpp 1600 于 LB 液体培养基 34℃ 培养过夜,按菌悬液与液体培养基 1:10(V:V)的比例,将菌悬液加入到约 30~40℃ 的 LB 固体培养基,制成含菌平板。

供试药剂均设置为 400 倍、700 倍和 1 000 倍 3 个浓度梯度,其质量浓度分别约为 2 500、1 500 和 1 000 μg/mL,以无菌去离子水处理作为对照,每个浓度均设置 3 次重复。

以抑菌圈法进行药剂初选,用打孔器在新鲜的含菌平板上垂直、均匀地打出 8 个直径 0.5 cm 的孔,分别注入约 40 μL 相同浓度的供试药剂,加入等量的无菌水作为空白对照,34℃ 培养 24 h,以十字交叉法测量抑菌圈直径,计算抑菌率,并利用 IBM SPSS 21 进行了两因素单变量的方差分析。

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{处理抑菌圈直径} - \text{对照抑菌圈直径}}{\text{处理抑菌圈直径}} \times 100\%$$

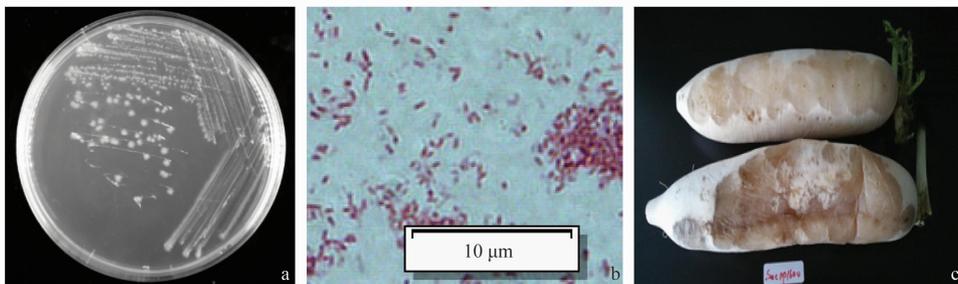
利用比浊法进行有效药剂毒力测定,药剂均设置至少 5 个梯度,以倍比法稀释得到,按药液与 LB 液体培养基 1:4 (V:V) 的比例将药液加入培养基,并加入 10  $\mu\text{L}$  菌悬液,每个浓度梯度重复 3 次,设置阴性及阳性对照,37 $^{\circ}\text{C}$  培养,当阳性对照 OD<sub>600</sub> 为 0.5 时,用酶标仪测所有处理吸光度,计算抑菌

率,抑菌率接近 1 的最低浓度为最小抑菌浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 致病菌形态观察

Secpp 1600 在 LB 固体培养基上 34 $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h,菌落多呈圆形,全缘,淡奶油色,中间突起,质地均匀,表面光滑稍透明(图 1a),经革兰氏染色鉴定为革兰氏阴性细菌,呈杆状(图 1b)。



a: 在 LB 培养基上, Secpp 1600 在 34 $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 之后菌落形态; b: 1 000 倍下菌体形态; c: Secpp 1600 侵染的萝卜软腐病症  
a: Colony morphology of Secpp 1600 strain at 34 $^{\circ}\text{C}$  on LB medium after 24 h; b: Cell morphology observed at 1 000 $\times$  magnification; c: The symptoms of the soft rot disease caused by Secpp 1 600 strain in *Raphanus sativus*

图 1 Secpp 1600 菌株培养特征和侵染萝卜的症状

Fig. 1 The culture characteristics of Secpp 1600 and symptoms of infected radish

### 2.2 侵染范围与致病力测定

结果显示,回接到萝卜的 Secpp 1600 致病力明显,受侵染的萝卜全部软腐甚至变软流水(图 1c),与田间症状一致。通过观察侵染其他蔬菜病症及统计致病力,发现 Secpp 1600 不侵染紫薯、杏鲍菇;对其他的蔬菜侵染较明显,能重度侵染蒜、葱、白菜,对上述蔬菜具有强致病力(表 1)。

表 1 Secpp 1600 对不同蔬菜的致病等级<sup>1)</sup>

Table 1 The disease grades of Secpp 1600 on different vegetables

蔬菜种类 Vegetable	Secpp 1600	CK
萝卜 Radish	+++++	—
马铃薯 Potato	+++	—
番茄 Tomato	+++	—
紫薯 Sweet potato	—	—
杏鲍菇 Mushroom	—	—
胡萝卜 Carrot	+++	—
冬瓜 Winter gourd	+++	—
莴苣 Lettuce	+++	—
辣椒 Pepper	+++	—
蒜 Garlic	—	—
蒜苗 Garlic bolt	+++++	—
葱 Green onion	+++++	—
结球甘蓝 Cabbage	++	—
白菜 Chinese cabbage	+++++	—

1) CK, 对照; 0 级, —; 1 级, +; 2 级, ++; 3 级, +++; 4 级, ++++; 5 级, +++++。

CK, control (DW, distilled water); grade 0, —; grade 1, +; grade 2, ++; grade 3, +++; grade 4, ++++; grade 5, +++++。

### 2.3 生理生化指标分析

通过生理生化指标测定与分析,发现 Secpp 1600 能氧化发酵葡萄糖,在 King's B 培养基上不能产生荧光色素,在硝酸还原、卵磷脂试验、吲哚产生、MR-VP 试验、氧化酶活性和酪蛋白水解试验中均表现为阳性。在硝酸还原试验中,Secpp 1600 直接还原 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 到氮气;Secpp 1600 不能产生过氧化氢酶;Secpp 1600 能利用 D-(—)果糖、 $\alpha$ -D-乳糖、D-(+)-棉籽糖等,不能利用 D-(+)-海藻糖、D-(+)-松三糖、 $\beta$ -龙胆二糖等,能微弱地利用 D-(+)-麦芽糖、糊精(表 2)。以上结果显示,在重要的含碳有机物代谢的种间差异指标上,根据 Samson 等展示的结果,Secpp 1600 与“Phenon1”的测定结果类似,该菌株能代谢  $\beta$ -龙胆二糖<sup>[3]</sup>;根据 Van der Wolf 等展示的结果,该菌株与 *D. solani* 和 *D. dadantii* subsp. *dadantii* 结果类似<sup>[17]</sup>;根据 Parkinson 等展示的结果,该菌株与 *D. dadantii* subsp. *dadantii* NCPPB 898<sup>T</sup> 的结果类似<sup>[18]</sup>,不同的是 Secpp 1600 能水解酪蛋白;根据胡白石等展示的结果,该菌株与 *D. dadantii* subsp. *dadantii* NCPPB898、*D. fangzhongdai*、*D. solani* NCPPB4479<sup>T</sup> 和 *D. zae* NCPPB3531 特征类似,不同之处在于  $\beta$ -龙胆二糖代谢和酪蛋白的水解<sup>[19]</sup>。因此,根据以上结果可以初步明确 Secpp 1600 属于 *Dickeya* 属,但是由于含碳有机物代谢上的差异还不足以确定其种名。

表 2 Secpp 1600 菌株生理生化特点<sup>1)</sup>

Table 2 Physicochemical characteristics of Secpp 1600 strain

生理生化试验 Physicochemical test	结果 Result	生理生化试验 Physicochemical test	结果 Result
革兰氏染色 Gram's staining	—	葡萄糖 <i>D</i> -(+)-Glucose	+
葡萄糖氧化发酵试验 O-F test	+	蔗糖 Sucrose	+
荧光色素产生 Fluorescent pigment production	—	核糖 <i>D</i> -Ribose	+
氧化酶活性 Oxidase activity	Delayed+	甘露糖 <i>D</i> -Mannose	+
硝酸还原 Nitrate reduction	+	木聚糖 Xylan	+
明胶水解 Gelatin hydrolysis test	+	肌醇 Inositol	+
卵黄反应 Egg yolk reaction	+	木糖 <i>D</i> -Xylose	+
酪蛋白水解 Hydrolysis of casein	+	半乳糖醇 Dulcitol	—
H <sub>2</sub> S 产生 H <sub>2</sub> S production	V	乳糖 $\alpha$ - <i>D</i> -Lactose	+
磷酸酶试验 Phosphatase test	+	半乳糖 <i>D</i> -Galactose	+
过氧化氢酶试验 Catalase test	—	阿拉伯糖 <i>L</i> -(+)-Arabinose	+
吲哚产生 Indole production	+	纤维二糖 <i>D</i> -(+)-Cellobiose	+
VP 试验 Voges-Proskauer test	+	麦芽糖 <i>D</i> -(+)-Maltose	W
甲基红试验 Methyl Red test	+	糊精 Dextrin	W
果糖 <i>D</i> -(-)-Fructose	+	甘油 Glycerol	+
海藻糖 <i>D</i> -(+)-Trehalose	—	水杨苷 <i>D</i> -Salicin	+
山梨醇 <i>D</i> -Sorbitol	—	蜜二糖 Melibiose	+
甲基- $\alpha$ - <i>D</i> -吡喃半乳糖苷 Methl- $\alpha$ - <i>D</i> -glucopyranoside	—	松三糖 <i>D</i> -(+)-Melezitose	—
甘露醇 Mannitol	+	5-氧代葡萄糖酸钾 5-keto- <i>D</i> -gluconate	—
苹果酸 <i>L</i> -Malic acid	+	棉籽糖 <i>D</i> -(+)-Raffinose	+
乳酸 Lactic acid	+	龙胆二糖 $\beta$ -Gentiobiose	+

1) 100% 阳性反应, +; 100% 阴性反应, —; 菌株间不稳定的反应, V; 微弱的反应, W。  
100% positive, +; 100% negative, —; Variable, V; Weak reaction, W.

2.4 MLSA-多位点序列分析

Ech586 等菌种的同源基因同源序列, 部分序列号如

通过 BLASTn 比对, 从 GenBank 中获取 Secpp 1600、  
*D. dadantii* DSM 18020、*D. dadantii* 3937、*D. zeae*

表 3 所示, 从 ASAP 数据库获取其他菌株部分相关  
序列如表 3 所示。

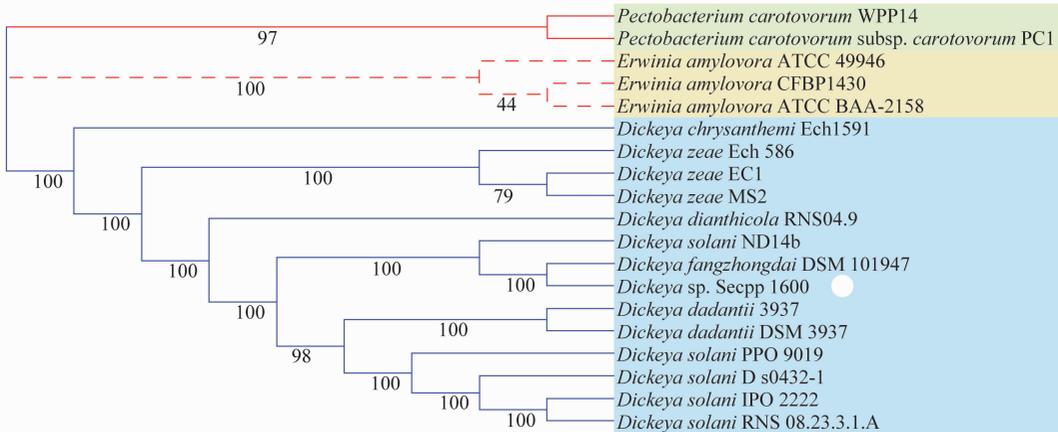
表 3 *gapA*, *icdA*, *mdh*, *pgi*, *proA* 和 *rpoS* 基因在部分相关菌株中的 NCBI 序列号和 ASAP 序列号

Table 3 NCBI accession numbers and ASAP IDs of *gapA*, *icdA*, *mdh*, *pgi*, *proA* and *rpoS* genes of some reference strains in GenBank and ASAP database

菌株 Strain	<i>gapA</i>	<i>icdA</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>proA</i>	<i>rpoS</i>
Secpp 1600	CP023484.1; 2413127-2414122	CP023484.1; 2717557-2718810	CP023484.1; 657191-658132	CP023484.1; 4544359-4546007	CP023484.1; 3958016-3959269	CP023484.1; 4029324-4030316
<i>D. dadantii</i> DSM 18020	CP023467.1; 2393176-2394171	CP023484.1; 2690593-2691846	CP023484.1; 669706-670647	CP023484.1; 4389844-4391493	CP023484.1; 3812065-3813318	CP023484.1; 3883835-3884827
<i>D. solani</i> PPO 9019	CP017454.1; 442377-443372	CP017454.1; 136513-137766	CP009460.1; 2124589-2125530	CP017454.1; 3309409-3311057	CP009460.1; 3952941-3954194	CP017454.1; 3865856-3866848
<i>D. solani</i> D s0432-1	CP017453.1; 449156-450151	CP017453.1; 143291-144544	CP017453.1; 2088892-2089833	CP017453.1; 3316193-3317841	CP017453.1; 3943827-3945080	CP017453.1; 3873394-3874386
<i>D. solani</i> IPO 2222	CP015137.1; 4467515-4468510	CP015137.1; 4773122-4774375	CP015137.1; 2827833-2828774	CP015137.1; 1599820-1601468	CP015137.1; 972581-973834	CP015137.1; 1043275-1044267
<i>D. dianthicola</i> RNS04.9	CP017638.1; 1894890-1895885	CP017638.1; 2157545-2158798	CP017638.1; 406805-407746	CP017638.1; 3910856-3912504	CP017638.1; 3308211-3309464	CP017638.1; 3377260-3378252
<i>D. zeae</i> MS2	CP025799.1; 2255968-2256963	CP025799.1; 2521093-2522346	CP025799.1; 644810-645751	CP025799.1; 4143589-4145237	CP025799.1; 3599814-3601067	CP025799.1; 3669252-3670244
<i>D. zeae</i> EC1	CP006929.1; 2049504-2050499	CP006929.1; 2294955-2296208	CP006929.1; 635329-636270	CP006929.1; 3995120-3996768	CP006929.1; 3386931-3388184	CP006929.1; 3456559-3457551
<i>D. solani</i> RNS 08.23.3.1.A	CP016928.1; 205811-206806	CP016928.1; 511418-512671	CP016928.1; 3488597-3489538	CP016928.1; 2260569-2262217	CP016928.1; 1633331-1634584	CP016928.1; 1704024-1705016
<i>D. fangzhongdai</i> DSM 101947	CP025003.1; 2401660-2402655	CP025003.1; 2694996-2696249	CP025003.1; 735635-736576	CP025003.1; 4464250-4465898	CP025003.1; 3852419-3853672	CP025003.1; 3923308-3924300
<i>D. solani</i> ND14b	CP009460.1; 447355-448350	CP009460.1; 160246-161499	CP009460.1; 2124589-2125530	CP009460.1; 3363321-3364969	CP009460.1; 3952941-3954194	CP009460.1; 3882332-3883324
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>arotovororum</i> PC1	AFL-0006828	AFL-0006720	AFL-0005107	AFL-0009008	AFL-0009043	AFL-0008504

通过 6 个看家基因 *gapA*, *icdA*, *pgi*, *proS*, *mdh* 和 *proA* 联合系统进化树结果分析(图 2), *Dickeya*、*Erwinia* 和 *Pectobacterium* 属的菌株分别以较高的 Bootstrap value 聚在不同分支,说明同属的菌株亲

缘关系较近。*Dickeya* sp. Secpp 1600 和 *D. fangzhongdai* DSM 101947 聚类在亲缘关系最近的一个分支, Bootstrap value 达 100, 序列同源性较高, 两个菌株亲缘关系较近, 与生理生化结果基本统一。



置信度水平由自展值(Bootstrap value)估计设定 1 000 次重复。绿色、橙色和蓝色背景进化支分别代表 *Pectobacterium*、*Erwinia* 和 *Dickeya* Bootstrap values are calculated by 1 000 replicates. The green, orange and blue are as indicate *Pectobacterium*, *Erwinia* and *Dickeya*, respectively

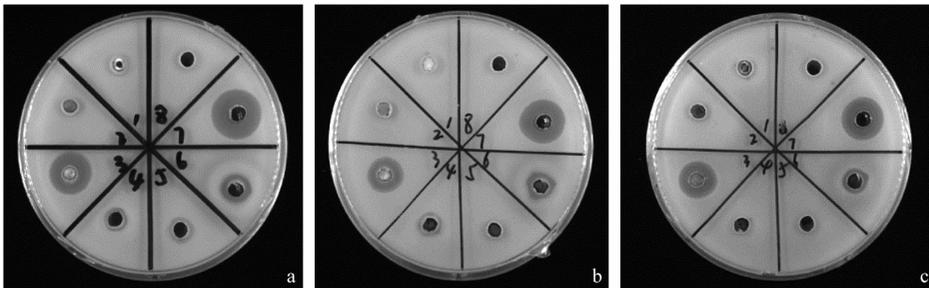
图 2 *Dickeya*, *Erwinia* 和 *Pectobacterium* 19 个菌株的 6 个看家基因 *icdA*, *pgi*, *proS*, *mdh*, *proA*, *mtlD* 多位点系统发育树

Fig. 2 The original tree of concatenated sequences of *gapA*, *icdA*, *pgi*, *proS*, *mdh*, *proA* of 24 strains belonging to the genus *Dickeya*, *Erwinia* and *Pectobacterium* by using the neighbor-joining method

## 2.5 杀菌剂的室内防效测定

预筛选药效试验表明,春雷霉素、波尔多液、SPP1 和 SPP2 对病原菌没有抑菌作用;农用链霉素、SPP3 和 SPP4 可抑制病菌生长,其中农用链霉

素与 SPP4 抑菌效果较好,与 SPP3 药剂抑菌效果差异显著( $P < 0.05$ );在这 3 种药剂处理中,不同梯度间抑菌效果无显著差异(表 4);抑菌圈效果如图 3 所示。



a: 2 500  $\mu\text{g/mL}$ ; b: 1 500  $\mu\text{g/mL}$ ; c: 1 000  $\mu\text{g/mL}$ ; 1: 春雷霉素; 2: 波尔多液; 3: 农用链霉素; 4: SPP1; 5: SPP2; 6: SPP3; 7: SPP4; 8: 对照  
a: 2 500  $\mu\text{g/mL}$ ; b: 1 500  $\mu\text{g/mL}$ ; c: 1 000  $\mu\text{g/mL}$ ; 1: Kasugamycin; 2: Bordeaux mixture; 3: Agricultural streptomycin; 4: SPP1; 5: SPP2; 6: SPP3; 7: SPP4; 8: CK

图 3 不同浓度杀菌剂抑菌效果

Fig. 3 Antibacterial effects of bactericides at different concentrations

选取农用链霉素、SPP3 及 SPP4 通过比浊法进行了最小抑制浓度(MIC)测定。结果显示(表 5), MIC 分别为 1 080、1 800 和 900  $\mu\text{g/mL}$ , SPP4 MIC 最低,毒力最强,其次为农用链霉素,最后为 SPP3。

## 3 结论与讨论

*Dickeya* 是由 Samson 等于 2005 年对“*E. chrysan-*

*themii* complex”重新分类成立的新属<sup>[3]</sup>,其中一些菌种的分类地位一直在修订,新种也在不断加入。Brady、Van der Wolf、Parkinson 等先后利用生理生化鉴定方法、DNA 杂交、16S rDNA 序列比对、多基因联合系统发育分析和核苷酸一致性分析等鉴定方法丰富了 *D. dadantii*、*D. solani*、*D. aquatica* 等菌种<sup>[17-18, 20]</sup>。胡白石等利用以上类似方法及脂肪酸分析等成立了包含

表 4 3 种药剂对 *Secpp 1600* 的抑菌率<sup>1)</sup>

Table 4 The inhibition rates of 3 bactericides to *Secpp 1600*

药剂 Bactericide	处理浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Concentration	抑菌率/% Inhibition rate
72% 农用链霉素 WP agricultural streptomycin 72% WP	2 500	(63±0.04)a
	1 500	(56±0.02)a
	1 000	(56±0.05)a
SPP3	2 500	(44±0.00)b
	1 500	(44±0.00)b
	1 000	(35±0.05)b
SPP4	2 500	(59±0.09)a
	1 500	(61±0.06)a
	1 000	(61±0.06)a

1) 数据为平均值±标准差, 同列数据后不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

Data are presented as mean±standard deviation, different lowercase letters in the same column indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

表 5 3 种药剂对 *Secpp 1600* 的最小抑菌浓度<sup>1)</sup>

Table 5 The minimal inhibition concentrations of 4 bactericides to *Secpp 1600*

药剂 Bactericide	处理浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Concentration	抑菌率/% Inhibition rate	最小抑制浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ MIC
72% 农用链霉素 WP agricultural streptomycin 72% WP	3 000.00	100±0.09	
	1 800.00	100±0.06	
	1 080.00	100±0.03	
	648.00	39±0.08	
	388.80	35±0.04	1 080.00
	233.28	29±0.07	
	139.97	32±0.07	
	83.98	28±0.02	
	50.39	30±0.04	
	30.23	10±0.12	
SPP3	5 000.00	99±0.00	
	3 000.00	99±0.00	
	1 800.00	99±0.00	
	1 080.00	55±0.02	
	648.00	26±0.03	1 800.00
	388.80	27±0.08	
	233.28	17±0.05	
	139.97	14±0.09	
	83.98	12±0.05	
	SPP4	2 500.00	100±0.00
1 500.00		100±0.00	
900.00		98±0.03	
540.00		49±0.01	900.00
324.00		51±0.01	
194.40		48±0.02	
116.64		49±0.02	

1) 数据为平均值±标准差。

Data are presented as mean±standard deviation.

3 个菌株的 *D. fangzhongdai* 新种<sup>[19]</sup>。当前 *Dickeya* 属主要包括 *D. dadantii*, *D. chrysanthemi*, *D. solani* 和 *D. zea* 等 8 个种<sup>[21]</sup>。微生物分类的动态发展大大促进了高度同源的 *Dickeya* 属菌种鉴定方法体系的形成, 以上研究为软腐病菌的鉴别、鉴定提供了重要的理论依据和技术支持。但是该种水平的分类仍然存在一定的争议。

对 *Secpp 1600* 进行生理生化鉴定的结果表明, *Secpp 1600* 与 *D. dadantii*、*D. fangzhongdai*, *D. solani* 和 *D. zea* 菌株特征非常类似, 主要差异在于  $\beta$ -龙胆二糖代谢和酪蛋白的水解。从多序列比对的结果来看其聚类在 *Dickeya* 属, 与 *D. fangzhongdai*、*D. solani* 和 *D. dadantii* 关系最近。

当前, 化学防治仍为细菌性病害防治的主要手段, 铜制剂和抗生素为代表性药剂。目前抑菌效果显著的农用链霉素因禁用现已退市, 随着软腐病情的加剧及病菌抗性增强, 新药开发及筛选迫在眉睫; 而且对于突发性病害, 化学防治手段十分必要<sup>[22]</sup>。本研究为了筛选 *Dickeya* sp. *Secpp 1600* 防治药剂, 选用了传统药剂及新药共 7 种药剂进行室内防效测定, 结果显示春雷霉素、波尔多液、SPP1 和 SPP2 对该病原菌无直接抑制作用, 农用链霉素、SPP3 和 SPP4 可直接抑制该病菌的生长。SPP4 的最小抑制浓度远小于农用链霉素, 也表明其有替代农用链霉素和进一步开发的潜力。通过回接到萝卜及对其他蔬菜的致病力检测, 该菌株能严重侵染多种经济作物, 易感寄主主要为十字花科和百合科蔬菜, 因此, 该菌株具有潜在的危害多种经济作物的能力, 应重视对该病害的预防, 防治上要有侧重和策略, 作物轮作应避开易感作物, 并及时清洁田园。

### 参考文献

[1] MANSFIELD J, GENNIN S, MAGORI S, et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(6):614-629.

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

[3] SAMSON R, LEGENDRE J B, CHRISTEN R, et al. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* 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 zaeae* sp. nov. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(4):1415 - 1427.
- [4] 邱正明,郭凤领,聂启军,等. 我国高山蔬菜产业可持续发展对策[J]. 长江蔬菜,2006(11):1 - 4.
- [5] 别之龙. 高山蔬菜发展的背景和可持续发展的建议[J]. 长江蔬菜,2006(11):5 - 6.
- [6] 王文峰,张秀玲,司东霞,等. 钾对大白菜软腐病发生及保护酶活性的影响[J]. 安徽农业科学,2017,45(33):39 - 41.
- [7] 邹婧泽,严准,程毅,等. 三个萝卜主产区软腐病病原菌的分离与鉴定[J]. 湖北农业科学,2016,55(23):6130 - 6133.
- [8] KING E O, WARD M K, RANEY D E, et al. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein[J]. Translational Research, 1954, 44(2):301 - 307.
- [9] KOVACS N. Identification of pseudomonas pyocyanea by the oxidase reaction [J]. Nature, 1956, 178(4535):703.
- [10] MOSCA C O, MORAGUES M D, LLOVO J, et al. Casein agar: A useful medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(3):1259 - 1262.
- [11] SATTA G, GRAZI G, VARALDO P E, et al. Detection of bacterial phosphatase activity by means of an original and simple test [J]. Journal of Clinical Pathology,1979,32(4):391 - 395.
- [12] FALGUNI P, SHARMA M C. Study on microbial alkaline phosphatase production from north gujarat field soils [J]. International Journal of Institutional Pharmaceutical Sciences, 2014, 4:83 - 91.
- [13] RADIX S, SAWADA H, TAKIKAWA Y. Phylogenetic study of japanese *Dickeya* spp. and development of new rapid identification methods using PCR-RFLP [J]. Journal of General Plant Pathology, 2014, 80(3):237 - 254.
- [14] 晋知文,宋加伟,谢学文,等. 芹菜细菌性软腐病病原的分离与鉴定[J]. 植物病理学报,2016,46(3):304 - 312.
- [15] VAIDYA G, LOHMAN D J, MEIER R. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information [J]. Cladistics, 2011, 27(2):171 - 180.
- [16] LETUNIC I, BORK P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees [J]. Nucleic Acids Research,2016,44(W1):242 - 245.
- [17] VAN DER WOLF J M, NIJHUIS E H, KOWALEWSKA M J, et al. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*) [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(PART 3):768 - 774.
- [18] PARKINSON N, DEVOS P, PIRHONEN M, et al. *Dickeya aquatica* sp. nov., isolated from waterways [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014,64 (PART 7):2264 - 2266.
- [19] TIAN Yanli, ZHAO Yuqiang, YUN Xiaoli, et al. *Dickeya fangzhongdai* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from pear trees (*Pyrus pyrifolia*) [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,2016,66:2831 - 2835.
- [20] BRADY C L, CLEENWERCK L, DENMAN S, et al. Proposal to reclassify *Bremneria quercina* (Hildebrand and Schroth 1967) Hauben et al. 1999 into a new genus, *Lonsdalea* gen. nov., as *Lonsdalea quercina* comb. nov., descriptions of *Lonsdalea quercina* subsp. *quercina* comb. nov., *Lonsdalea quercina* subsp. *iberica* subsp. nov. and *Lonsdalea quercina* subsp. *britannica* subsp. nov., emendation of the description of the genus *Brenneria*, reclassification of *Dickeya dieffenbachiae* as *Dickeya dadantii* subsp. *dieffenbachiae* comb. nov., and emendation of the description of *Dickeya dadantii* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62(7):1592 - 1602.
- [21] 冯洁. 植物病原细菌分类最新进展[J]. 中国农业科学,2017, 50(12):2305 - 2314.
- [22] 晋知文,谢学文,马墨,等. 蔬菜细菌性软腐病防治药剂活体组织筛选技术[J]. 植物保护学报,2017,44(2):269 - 275.

(责任编辑:田喆)