

甘薯茎腐病症状及其病原鉴定

沈肖玲¹, 林钗², 钱俊婷⁴, 仇智灵³, 陈江彬³, 孙超¹, 易建平⁴, 楼兵干^{1*}

(¹浙江大学生物技术研究所, 杭州 310058; ²浙江省农业教育培训中心, 杭州 310029;

³临安市农业技术推广中心, 临安 311300; ⁴上海出入境检验检疫局, 上海 200135)

摘要:甘薯茎腐病是危害甘薯的一种严重病害,甘薯茎、叶柄、叶片和块根均可被害。该病典型症状是茎基部发黑和变软腐烂,叶发黄,茎和块根维管束黑褐色,引起块根腐烂、有臭味。通过对甘薯茎腐病典型症状样本的采集、病原菌的分离和纯化以及致病性测定,明确该病害是一种细菌病害。通过对甘薯茎腐病菌的菌体形态和培养特性观察发现,病原菌是革兰氏阴性细菌,菌体短杆状,大小约为 2.36 μm ×0.4 μm ,周生鞭毛,可在烟草上激发过敏反应(HR)。Biolog 测定、脂肪酸分析、16S rDNA 序列分析、MALDI-TOF 质谱鉴定和 8 个看家基因(*dnaX*、*rplB*、*fusA*、*gapA*、*gyrA*、*purA*、*recA* 和 *rpoS*)的序列系统发育分析,发现该病原菌与达旦提狄克氏菌 *Dickeya dadantii* 高度一致。这些结果说明,浙江省发生的小番薯病害是甘薯茎腐病,病原为 *D. dadantii*。

关键词:脂肪酸分析;16S rDNA;MALDI-TOF 质谱鉴定;看家基因;达旦提狄克氏菌

Characterization of stem and root rot symptoms of sweet potato and the causal pathogen of the disease

SHEN Xiao-ling¹, LIN Chai², QIAN Jun-ting⁴, QIU Zhi-ling³, CHEN Jiang-bin³, SUN Chao¹, YI Jian-ping⁴, LOU Bing-gan¹ (¹Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; ²Zhejiang Agricultural Education & Training Center, Hangzhou 310029, China; ³Lin-an Agricultural Technology Extension Center, Lin'an 311300, China; ⁴Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

Abstract: Bacterial stem and root rot of sweet potato is a severe disease which can infect its stems, petioles, leaves and tuberous roots. The typical symptoms of the disease include black and rot basal stems, yellow leaves, dark brown vascular stems and smelly tuberous roots. On the basis of typical symptoms, pathogen isolation, purification and pathogenicity test, it was confirmed that it was a bacterial disease. Through the observation of the bacterial morphological and cultural characteristics, it was found that the pathogen is a short rod-shaped, gram-negative bacterium with peritrichous flagella, 2.36 μm × 0.4 μm in size, and can elicit the hypersensitive response (HR) in tobacco. According to Biolog test, analysis of fatty acid methyl esters and 16S rDNA sequence, MALDI-TOF mass spectrometry test and phylogenetic sequence analysis of 8 house-keeping genes, *dnaX*, *rplB*, *fusA*, *gapA*, *gyrA*, *purA*, *recA* and *rpoS*, it was found that the pathogen shares high similarity with *Dickeya dadantii*. These results indicated that the stem rot disease of sweet potato in Zhejiang Province was caused by *D. dadantii*.

Key words: fatty acid methyl esters; 16S rDNA; MALDI-TOF; house-keeping gene; *Dickeya dadantii*

中图分类号: S432.42

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2018)01-0025-10

收稿日期: 2017-02-20; 修回日期: 2017-04-23; 网络出版时间: 2017-04-25

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.S.20170425.1806.001.html>

基金项目: 浙江省农业厅“三农六方”项目(CTZB-F160728AWZ-SNY1-3); 杭州市重点科技发展计划项目(20172015A09)

通讯作者: 楼兵干, 博士, 教授, 主要从事植物细菌病害及植物检验检疫的研究; E-mail: bglou@zju.edu.cn

第一作者: 沈肖玲, 硕士研究生, 研究方向为植物细菌病害的研究; E-mail: 594153812@qq.com。

随着人们物质生活水平的不断提高,被称为健康食品和抗癌食品的“小番薯”*Ipomoea batatas*,特别受消费者喜爱,种植面积不断扩大。2015年,在浙江省临安市小番薯生产基地发生了一种浙江省未曾发生过的病害,症状疑似甘薯茎腐病的病害大面积严重发生。

甘薯茎腐病于1974年首次在美国报道^[1],1977年确认病原菌为“以往”菊欧文氏菌 *Erwinia chrysanthemi*^[2]。日本和委内瑞拉于1998和1999年相继报道该病害^[3,4]。2011年Huang等^[5]对我国甘薯茎腐病的病原进行了分离鉴定,2013年Qin等^[6]和2015年Gao等^[7]分别对河南和河北省甘薯茎腐病的病原进行了分离鉴定,他们对病原菌的分子生物学鉴定都依据16S rDNA序列的测定分析,分别认为“以往”菊欧文氏菌 *E. chrysanthemi*^[5,6]和达旦提狄克氏菌 *Dickeya dadantii*^[7]是该病害的病原。“以往”菊欧文氏菌 *E. chrysanthemi* 寄主范围十分广泛,可寄生为害花卉、蔬菜、经济和粮食作物等60余种植物。2005年Samson等^[8]将“以往”*E. chrysanthemi*从*Erwinia*属中拉出,建立新属狄克亚属 *Dickeya* (Syn. *E. chrysanthemi*)。该属共有8个种和1个亚种,分别是香石竹狄克氏菌 *D. dianthicola*、达旦提狄克氏菌 *D. dadantii*、玉米狄克氏菌 *D. zea*、菊狄克氏菌 *D. chrysanthemi*、香蕉狄克氏菌 *D. paradisiaca*、水生狄克氏菌 *D. aquatica*^[9]、茄狄克氏菌 *D. solani*^[10]、方中达狄克氏菌 *D. fangzhongdai*^[11]和达旦提狄克氏菌花叶万年青亚种 *D. dadantii* subsp. *dieffenbachiae*^[12],其中甘薯茎腐病病原菌 *D. dadantii* 被列入国际公认的十大类植物病原细菌之一^[13]。由于该属细菌种之间具有高度的同源性,仅基于16S rDNA序列分析,不足以区分不同的种。另一方面,纵观国内外有关甘薯茎腐病的症状报道,不管是自然发病的症状还是接种发病的症状,对症状的描述都很简单,也没有用清晰的图来说明,直接影响对该病害的诊断和有效防控。为此,我们对甘薯茎腐病的症状作了细致的观察研究,对病原菌作了深入系统的鉴定,认为浙江省发生的病原为达旦提狄克氏菌 *D. dadantii*。

1 材料与方法

1.1 病害调查及病原菌的分离

调查在杭州市临安於潜镇甘薯种植区进行,分

为普查和定点、定期观察。普查主要对不同地点、不同播种期、不同品种“茎腐病”的发生情况进行系统观察。从2015年夏至2016年秋,在病害发生季节定点观察病害的发生、发展情况。

采集具典型“茎腐病”症状的茎蔓、叶柄、叶片与薯块用于病原菌分离。按参考文献[5]中的方法进行分离,纯化后挑取30个单菌落于4℃冰箱保存,用于后续的致病性测定,进行柯赫氏法则验证。

1.2 致病性测定

将上述分离保存的菌株进行致病性测定,供试甘薯品种为心香(临安市农业技术推广中心提供)。不同菌株分别在NA培养基上划线28℃培养36h后配成约 3×10^8 CFU · mL⁻¹的菌悬液,采用针刺和喷雾方法分别在离体水培扦插薯苗和灭菌基质盆栽的薯苗上进行接种。

1.2.1 离体水培扦插苗针刺接种试验 用灭菌牙签蘸取1.2小节所述的菌悬液,分别在甘薯扦插苗的茎基部、中部和叶柄处接种,无菌水接种作为对照,健康苗插入装有无菌水的三角瓶中,接种位点离水面2cm,每株菌接种5株扦插苗和3株对照,置于25℃、RH≥85%的光照生化培养箱中培养,定时观察记载,并从病斑上再次进行分离。

1.2.2 盆栽苗针刺接种和喷雾接种试验 针刺接种:用牙签蘸取1.2小节所述的菌悬液,分别在已盆栽15d的甘薯扦插苗的茎基部、中部和叶柄处接种,每株菌接种5株扦插苗,无菌水接种作为对照,接种的甘薯苗套袋保湿48h,置于22℃~28℃玻璃温室中,定时观察记录,并从病斑上再次分离病菌。喷雾接种:将1.2小节所述的菌悬液喷在盆栽甘薯扦插苗的叶片、叶柄和主茎上,无菌水接种作为对照,接种后甘薯苗套袋保湿48h,置于22℃~28℃植物生长室中,定时观察记录,并从病斑上再次分离病菌。

1.3 病原菌菌落培养性状与菌体形态特征观察

挑选经过分离纯化和致病性测定的LA0302、LA0303、LA0305、LA0401、LA0402、LA0403、LA0404、LA0405、LA0801、LA0802共10株菌用于病原菌菌落培养性状与菌体形态特征观察,各菌株分别在NA平板培养基上培养48h后观察菌落形态,同时挑取培养24h的菌体,在浙江大学农生环

分析测试中心电镜室 Hitachi H-7650 型透射电镜下观察菌体形态和周生鞭毛,参照 Schaad 等的方法^[14]进行革兰氏染色。

1.4 病原菌的 Biolog 鉴定

供测菌株见表 3,除了同 1.3 小节所述的菌株外,还有 *Dickeya* 属的 5 种标准菌株, Biolog 鉴定在上海出入境检验检疫局动植物与食品检验检疫技术中心进行,试验采用 Biolog 公司生产的 GENIII 微孔板和相应数据库,按照操作规程,在 Biolog 通用培养基 BUGM (Biolog universal growth medium) 上培养菌体,在 BUGM 培养基 (51.7 g BUG 琼脂培养基,950 mL 蒸馏水)上 25℃ 培养 24 h 后在 MicroStation 自动快速微生物鉴定仪 (6.01 版) 进行鉴定。

1.5 病原菌的脂肪酸 (FAME) 鉴定

供测菌株同 1.4 小节,各菌株在 TSBA 培养基 [30 g 胰蛋白胍大豆肉汤 (Tryptic Soy Broth, TSB) + 15 g 琼脂 + 1 L 水, TSB 购于 Fisher 公司] 上于 28℃ 生长 36 h 后,分别用无菌接种环挑取约 40 mg 的菌体,经过皂化、甲基化、萃取、洗涤过程提取脂肪酸。脂肪酸鉴定在浙江大学农生环分析测试中心的全自动微生物鉴定系统—美国 Agilent 6890 型气相色谱仪上进行。鉴定结果通过专业的微生物鉴定系统软件—美国 MIDI 公司开发的基于细菌脂肪酸成分鉴定细菌的 MIS4.5 (microbial identification system) 和 LGS4.5 (library generation software) 获得。

1.6 基于 MALDI-TOF 质谱技术的鉴定

供测菌株同 1.4 小节, MALDI-TOF 质谱技术的鉴定在浙江大学分析测试中心的布鲁克·道尔顿公司生产的 ultrafleXtreme 型质谱仪上进行,各菌株在 NA 培养基上 28℃ 培养 24 h 挑取单菌落,直接涂抹到质谱专用靶板上,再将肉桂酸 (HCCA) 基质 1 μL 滴在样本上,自然干燥后,在 MALDI-TOF 质谱仪上进行测定。所获得的质谱图直接进入 Bruker MBT 菌株数据库检索完成鉴定。

1.7 多个看家基因的多重序列系统发育分析

供试菌株共 27 株包括 *Dickeya* 属中 8 个种和 1 个亚种的标准菌株 (表 1), 对本实验室分离经致病性测定的菌株 LA0302、LA0303、LA0305、

LA0401、LA0402、LA0403、LA0404、LA0405、LA0801、LA0802 和来自广东的菌株 E37 这 11 个菌株的 9 个基因位点 16S rDNA、*dnaX*、*fusA*、*gapA*、*gyrA*、*purA*、*recA*、*rpoS* 和 *rplB* 进行 PCR 扩增,扩增引物见表 2,扩增反应总体积为 50 μL,反应条件为 95℃ 预变性 4 min; 92℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min 共进行 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 反应在 S1000 型热循环仪上进行,取 5 μL 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收目标 DNA 片段,由上海生工生物工程有限公司进行测序,测序结果用 BLAST 软件与 GenBank 中的数据进行同源性比较。

采用同样的方法对 *D. aquatica* NCPPB 4580、*D. fangzhongdai* JS5 菌株的基因 *gyrA*、*rpoS* 的序列进行扩增测序分析和同源性比较,同时利用 GenBank 上已登录的 8 个种和 1 个亚种 (表 1) 的标准菌株 (上述基因除 16S rDNA 外的 8 个) 基因序列进行比较,用 ClustalX2.1 软件进行多序列比对,用 Sequencematrix 软件联合各位点序列,采用邻接法 (Neighbor-joining method, NJ) 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 病害田间症状及其病原菌分离结果

甘薯茎腐病在甘薯苗期、生长期至贮藏期均可发生,可为害薯块、薯苗、藤蔓、叶柄和叶片。带菌种薯育苗发芽后 3~5 d,从芽基部开始沿茎蔓向上可见水渍状黑褐色斑,湿度大时引起叶柄叶片发黑腐烂。薯苗一般在春季扦插后 15~18 d、夏季扦插后 5~7 d 开始出现症状,发病速度迅猛,在田间有明显的发病中心 (图 1-A),一般田块发病率达 10%~20%,严重田块达 50% 以上,造成大面积死株,有的成畦成片死亡,甚至全田的薯苗死亡,严重影响甘薯的生产。该病典型症状:雨后初晴,叶片萎蔫,薯苗茎部、叶柄出现暗褐色至黑褐色软腐 (图 1-B),病健交界处有明显的水渍状斑,无菌脓,在阳光下,水渍状病斑很快干燥转成黑色干枯斑,叶片发黄、叶缘与叶片上可见黑褐色水渍状病斑,叶脉有变黑坏死的现象发生 (图 1-B),剖开茎蔓,维管束黑褐色 (图 1-D),横切茎蔓,除了见到维管束变黑外,可见白色汁液 (图 1-C),这白色汁液中

Table 1 Strain designations and its origin

Species name	Strain designations	Host	Origin
<i>Dickeya dadantii</i>	LA0401	<i>Ipomoea batatas</i>	Zhejiang, China, 2016
<i>D. dadantii</i>	LA0801	<i>I. batatas</i>	Zhejiang, China, 2016
<i>D. dadantii</i>	LA0302	<i>I. batatas</i>	Zhejiang, China, 2016
<i>D. dadantii</i>	LA0303	<i>I. batatas</i>	Zhejiang, China, 2016
<i>D. dadantii</i>	LA0305	<i>I. batatas</i>	Zhejiang, China, 2016
<i>D. dadantii</i>	LA0402	<i>I. batatas</i>	Zhejiang, China, 2016
<i>D. dadantii</i>	LA0403	<i>I. batatas</i>	Zhejiang, China, 2016
<i>D. dadantii</i>	LA0404	<i>I. batatas</i>	Zhejiang, China, 2016
<i>D. dadantii</i>	LA0405	<i>I. batatas</i>	Zhejiang, China, 2016
<i>D. dadantii</i>	LA0802	<i>I. batatas</i>	Zhejiang, China, 2016
<i>D. dadantii</i> *	E37	<i>I. batatas</i>	Guangdong, China, 2011
<i>D. dadantii</i> *	NCPPB 898	<i>Pelargonium capitatum</i>	Comoro Is, 1961
<i>D. dadantii</i>	NCPPB 3537	<i>Solanum tuberosum</i>	Peru, 1987
<i>D. dadantii</i> subsp. <i>dieffenbachiae</i> *	NCPPB 2976	<i>Dieffenbachia</i> sp.	USA, 1977
<i>D. solani</i>	IPO 3336	<i>S. tuberosum</i>	France, 2013
<i>D. solani</i>	IPO 3295	<i>S. tuberosum</i>	Finland, 2013
<i>D. dianthicola</i>	NCPPB 3534	<i>S. tuberosum</i>	Netherlands, 1987
<i>D. dianthicola</i>	IPO 980	<i>S. tuberosum</i>	Netherlands, 2013
<i>D. dianthicola</i>	IPO 3327	<i>Dianthus caryophyllus</i>	UK, 1957
<i>D. zea</i> *	NCPPB 3531	<i>S. tuberosum</i>	Australia, 1987
<i>D. chrysanthemi</i> *	NCPPB 402	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	USA, 1956
<i>D. chrysanthemi</i>	NCPPB 3533	<i>S. tuberosum</i>	USA, 1956
<i>D. chrysanthemi</i> pv. <i>Parthenii</i> *	NCPPB 1861	<i>Parthenium argentatum</i>	USA, 1966
<i>D. paradisiaca</i>	CFBP 3699	<i>Zea mays</i>	Cuba, 1987
<i>D. paradisiaca</i>	CFBP 3477	<i>Musa paradisiaca</i>	Colombia, 1968
<i>D. aquatica</i> *	NCPPB4580	River water	UK, 2012
<i>D. fangzhongdai</i> *	JS5	<i>Pyrus pyrifolia</i>	China, 2009

Note: The isolates with ‘ * ’ were provided by Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau.

Table 2 Primers for amplification of gene fragments involved in multilocus sequence analysis

Gene	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')	Reference
16S rDNA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	ACGGTTACCTTGTACGACTT	[15]
<i>rpoS</i>	ATGAGCCAAAGTACGCTGAA	ACCTGAATCTGACGAACACG	[16]
<i>rplB</i>	TTAACCTGAGCTGCACAAGG	GCGGCGTACGATGAATTTATC	[10]
<i>recA</i>	GGTAAAGGGTCTATCATGGG	CCTCACCATACATAATTTGGA	[17]
<i>purA</i>	AGAACGTTGTCGTACTIONGGCA	AGTGGAGTAGGCTTTGACGATACC	[10]
<i>gapA</i>	AAGTCAAAGACGGTCACCTGGT	CGATCAGGTCCAGAACCTTGTT	[10]
<i>gyrA</i>	AAATCGGCCGCCGYATMAA	TCCACCGGTTCCAGCVACRCG	[10]
<i>fusA</i>	CACCGGTGTGAACCACAAAA	TAGCCTTTCGGATTTGAGCC	[10]
<i>dnaX</i>	TATCAGGTYCTGCCCGTAAGTCC	TCGACATCCARCGCYTTGAGATG	[18]

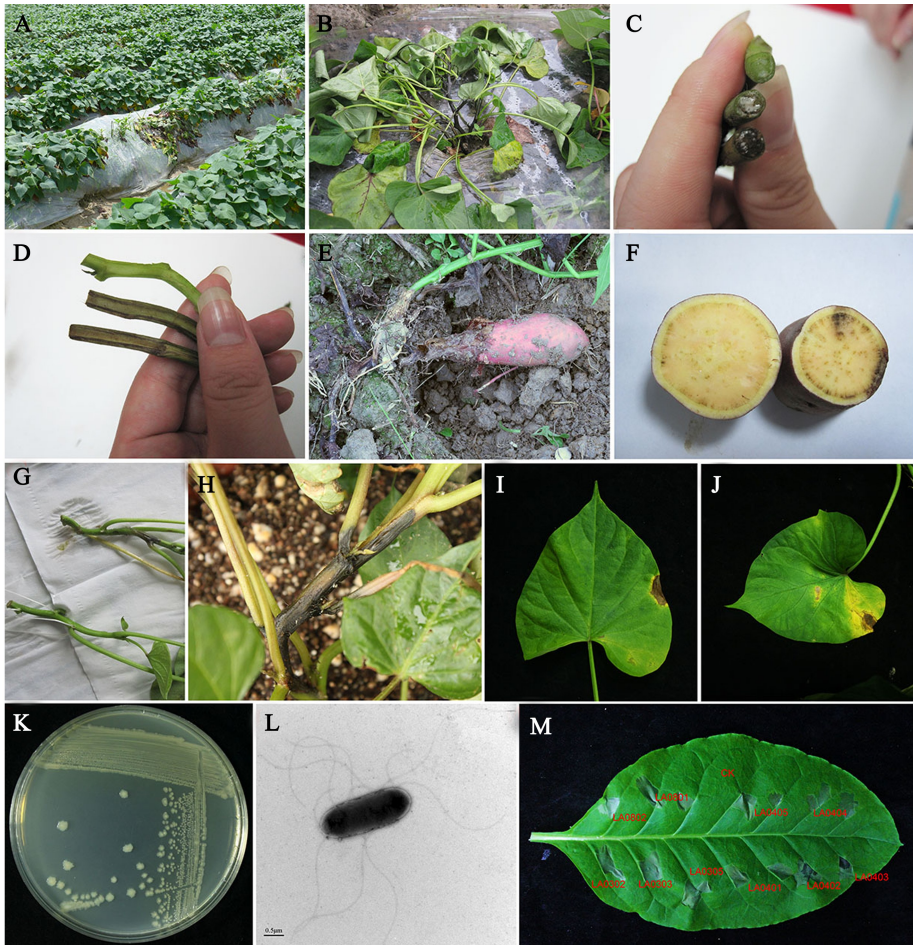


Fig. 1 Symptoms of bacterial stem and root rot of sweet potato in the field, results of pathogenicity and single colony on NA

A, B: Symptoms of bacterial stem and root rot of sweet potato in the field; C, D: Stems split widthwise and lengthwise to show discoloration and decay of vascular tissues and pith; E, F: Symptoms in the infected root tuber; G, J: Inoculated symptoms in stems and leaves; K: Single colony of isolate LA0401 growing on NA; L: *Dickeya dadantii* bacterium; M: Tobacco leaf showing typical hypersensitive response (dark areas) 24 h after injection with 10 isolates of stem and root rotting bacteria of sweet potato.

可分离到病原菌,但与其他细菌病害如茄科植物青枯病用手挤压茎维管束,可见白色菌脓溢出有所不同,因正常甘薯茎、叶柄折断均会出现大量白色汁液。植株早期发病全株枯死,中后期发病,藤蔓基部先出现黑褐色水渍状病斑,雨后或田间大水漫灌后病斑迅速向上下部扩展,导致植株死亡,侵染薯块,薯块表皮发黑(图 1-E),横切面和纵切面可见黑褐色病斑(图 1-F),贮藏期薯块初发病斑一般以芽眼为中心,圆形、稍凹陷、黑褐色,后逐渐扩大引起整薯腐烂,病部软化腐烂有臭味。

在发病的薯块、藤蔓、叶柄和叶片上,挑取 30 个

经分离纯化的单菌落,进行保藏,用于致病性试验。

2.2 致病性测定

水培扦插苗针刺接种后 24 h,主茎、叶柄上可见长 0.2~1.3 cm,宽 0.1~0.3 cm 大小不等的水渍状病斑(图 1-G);接种 48 h 后,叶柄有的已经折断,叶片枯死,主茎病斑进一步扩大,由水渍状成黄褐色;72 h 后,主茎病斑扩大绕茎一圈后折断。从叶柄与主茎病斑上再次分离病原菌,得到与接种体相同的分离物。

盆栽苗主茎针刺接种后 3 d 接种处出现水渍

状病斑,第4 d 病斑变黑、粘滑(图 1-H),植株叶片失水,萎蔫,症状与田间自然发病症状一样,从发病部位再次分离病原菌,得到与接种体相同的分离物。

盆栽苗喷雾接种 7 d 后,叶片上出现黑褐色斑,边缘黄色,病斑有的从叶缘开始(图 1-I~J),有的在叶片中间(图 1-J)开始发生,叶柄与主茎上未出现症状,从发病部位再次分离病原菌,得到与接种体相同的分离物。

致病性试验结果说明,病原菌可以从伤口侵入,也可以从气孔、水孔侵入。在条件适宜时,病原菌从侵入至发病速度很快,这与田间发病观察结果一致。

2.3 病原特性测定

选择分离获得经致病性测定的代表性菌株 LA0302、LA0303、LA0305、LA0401、LA0402、LA0403、LA0404、LA0405、LA0801 和 LA0802 分别在 NA 平板培养基上 28℃ 划线培养,12 h 可见菌落长出,48 h 后均形成淡土黄色、不透明、边缘

不整齐、表面凸起稍皱缩直径 2~3 mm 菌落(图 1-K)。革兰氏染色呈阴性反应,菌体短杆状,大小一般为 2.36 μm ×0.4 μm ,周生鞭毛(图 1-L)。

这 10 株代表菌注射接种烟草叶片,24 h 后均引起过敏性枯斑反应(图 1-L),对照无异常。

2.4 病原菌的脂肪酸(FAME)、Biolog、MALDI-TOF 质谱鉴定和 16S rDNA 序列测定比对结果

FAME 鉴定结果表明:本实验室分离的 10 个菌株和广东菌株 E37,除了菌株 LA0302 和 LA0402 与无丙二酸柠檬酸杆菌 *Citrobacter amalonaticus* 最相似外,其余菌株都与“以往”菊欧文氏菌 *E. chrysanthemi* 最相似,阳性对照标准菌株 NCPPB 898 也与“以往”*E. chrysanthemi* 最相似;供试的 *Dickeya* 属的其他 4 个种和 1 个亚种的标准菌株,有二个与 *C. amalonaticus* 最相似,有三个与“以往”*E. chrysanthemi* 最相似(表 3)。Biolog

Table 3 The results of FAMEs, Biolog and MALDI-TOF identification of the causal organism of bacterial stem and root rot of sweet potato

Strain code	FAMEs		Biolog		MALDI-TOF	
	SIM	System Identity	SIM	System Identity	Score Value	System Identity
LA0302	0.648	<i>Citrobacte ramalonaticus</i>	0.741	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	2.52	<i>D. dadantii</i>
LA0303	0.438	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	0.775	<i>D. chrysanthemi</i>	2.53	<i>D. dadantii</i>
LA0305	0.728	<i>E. chrysanthemi</i>	0.710	<i>D. chrysanthemi</i>	2.47	<i>D. dadantii</i>
LA0401	0.825	<i>E. chrysanthemi</i>	0.753	<i>D. chrysanthemi</i>	2.56	<i>D. dadantii</i>
LA0402	0.779	<i>C. amalonaticus</i>	0.759	<i>D. chrysanthemi</i>	2.41	<i>D. dadantii</i>
LA0403	0.847	<i>E. chrysanthemi</i>	0.760	<i>D. chrysanthemi</i>	2.36	<i>D. dadantii</i>
LA0404	0.842	<i>E. chrysanthemi</i>	0.764	<i>D. chrysanthemi</i>	2.71	<i>D. dadantii</i>
LA0405	0.643	<i>E. chrysanthemi</i>	0.722	<i>D. chrysanthemi</i>	2.63	<i>D. dadantii</i>
LA0801	0.905	<i>E. chrysanthemi</i>	0.724	<i>D. chrysanthemi</i>	2.58	<i>D. dadantii</i>
LA0802	0.658	<i>E. chrysanthemi</i>	0.725	<i>D. chrysanthemi</i>	2.39	<i>D. dadantii</i>
E37 *	0.775	<i>E. chrysanthemi</i>	0.753	<i>D. chrysanthemi</i>	2.02	<i>D. dadantii</i>
NCPPB 898 *	0.725	<i>E. chrysanthemi</i>	0.734	<i>D. chrysanthemi</i>	2.68	<i>D. dadantii</i>
NCPPB 2976 *	0.821	<i>E. chrysanthemi</i>	0.749	<i>D. chrysanthemi</i>	2.06	<i>D. dadantii</i>
NCPPB 3531 *	0.785	<i>E. chrysanthemi</i>	0.712	<i>D. chrysanthemi</i>	2.77	<i>D. zeae</i>
NCPPB 402 *	0.767	<i>E. chrysanthemi</i>	0.715	<i>D. chrysanthemi</i>	2.71	<i>D. chrysanthemi</i>
NCPPB 1861 *	0.674	<i>C. amalonaticus</i>	0.705	<i>D. chrysanthemi</i>	1.93	<i>D. chrysanthemi</i>
NCPPB 4580 *	0.868	<i>E. chrysanthemi</i>	0.724	<i>D. chrysanthemi</i>	1.63	<i>D. chrysanthemi</i>
JS5 *	0.771	<i>C. amalonaticus</i>	0.645	<i>D. chrysanthemi</i>	1.67	<i>D. dadantii</i>

Note: The isolates with ‘*’ were provided by Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau.

鉴定结果表明:供测定的 10 个菌株、广东菌株 E37、阳性对照标准菌株 NCPPB 898 和 *Dickeya* 属的其他 4 个种和 1 个亚种的标准菌株都与 *D. chrysanthemi* 最相似(表 3)。MALDI-TOF 质谱鉴定结果表明:供测定的 10 个菌株、广东菌株 E37、阳性对照标准菌株 NCPPB 898 和 *D. dadantii* subsp. *dieffenbachiae* NCPPB 2976 都是 *D. dadantii* (表 3), *D. chrysanthemi* NCPPB 402 和 *D. chrysanthemi* pv. *Parthenii* NCPPB 1861 都是 *D. chrysanthemi*, *D. zea* 标准菌株 NCPPB 3531 是 *D. zea* 而其他二个种的标准菌株只能鉴定到属,因为 MALDI-TOF 的 Bruker MBT 数据库中目前还没有 *D. aquatica* 和 *D. fangzhongdai* 这二个种的相关信息。相似性系数匹配程度的原则是 FAME 和 Biolog, 系数 <0.2 , 结果不可用;系数 ≥ 0.5 , 鉴定到属种;MALDI-TOF 分值说明,分值 2.3~3.0 之间,鉴定到种,2.0~2.299 之间鉴定到属种,1.7~1.999 之间鉴定到属,0.0~1.699 之间结果不可用。

对本实验室分离的 10 个菌株(表 3)进行 16S rDNA 扩增、测序,得到 1 541 bp 序列,序列经 BLAST 软件与 GenBank 中的核酸数据进行同源性比较,分别与这 10 株致病菌的 16S rDNA 序列同源性达到 99% 的至少有 10 个菌株,多数为 *D. dadantii* 和“以往”*E. chrysanthemi* (包括国内 2011 年报道的甘薯茎腐病病原菌 H12 和 09-1)^[5],除此之外,还与 *D. aquatica*、*D. dianthicola*、*D. chrysanthemi*、*D. dadantii* subsp. *dieffenbachiae*、*Cedecea neteri* 和 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 的序列也达到了 99% 的相似。

2.5 多个看家基因的多重序列系统发育分析

测定了本实验室分离的代表性菌株 LA0302、LA0303、LA0305、LA0401、LA0402、LA0403、LA0404、LA0405、LA0801 和 LA0802 和来自广东的 E37 在 *rplB*、*recA*、*purA*、*gapA*、*fusA*、*dnaX*、*rpoS* 和 *gyrA* 等 8 个基因位点上的序列并进行 BLAST 比对,发现这 11 个菌株在每个基因位点上的序列均能与 *D. dadantii* 标准菌株 NCPPB 3937 有 99% 以上的相似性,且多数基因的同源性达到 100%,这说明从临安发病甘薯上分离得到的菌株与 Huang 等^[5]从广东甘薯发病区分离得到的菌株 E37 一致,且均为达旦提狄克氏菌 *D. dadantii*。将

这些序列递交至 GenBank 获得 GenBank 登录号,利用 MEGA 6.06 版软件对 11 个供试菌株以及已登录 GenBank 的 *Dickeya* 属 8 个种和 1 个亚种的代表性菌株基于 8 个基因位点构建系统发育树(未提供图),同时,用 ClustalX2.1 软件多序列比对,用 Sequencematrix 软件联合各位点序列构建串级序列系统发育树(图 2)。进化树采用邻接法(Neighbor-joining method, NJ)构建,树中节点的自举置信度水平由自展值(Bootstrap value)估计,重复次数为 1 000。结果显示不同基因序列构建系统发育树结果以及合并序列的构建系统发育树结果基本一致。根据各个基因位点构建系统发育树,发现 LA0302、LA0303、LA0305、LA0401、LA0402、LA0403、LA0404、LA0405、LA0801 和 LA0802 以及 E37 与 *D. dadantii* 代表性菌株均以较高的自举置信度位于同一分支上(未提供图)。根据串级序列系统发育树,可以看到 LA0302、LA0303、LA0305、LA0401、LA0402、LA0403、LA0404、LA0405、LA0801 和 LA0802 聚为一支,自举置信度为 96%,显示出十分亲密的关系。E37 与本实验室菌株以 97% 的置信度聚为一支,说明虽然同源性高,但 E37 与临安分离菌株之间存在一定的差异。而供试菌株与 *D. dadantii* 代表性菌株 IPO 3332、NCPPB 898 和 NCPPB 2976 聚在一起,亲缘关系最近,与 *Dickeya* 属其他种的亲缘关系均较远。结合 Blast 比对结果与系统发育分析结果,可以将临安分离的这 10 株菌 LA0302、LA0303、LA0305、LA0401、LA0402、LA0403、LA0404、LA0405、LA0801 和 LA0802 确定为达旦提狄克氏菌 *Dickeya dadantii*。

3 结论与讨论

甘薯茎腐病是近年来我国甘薯上发生较严重的细菌病害,在甘薯整个生育期都可发生,田间典型症状是茎蔓、叶柄水渍状发黑枯死,发病的严重程度与品种、温度、湿度、降雨量等密切相关。据 Schaad & Brenner 报道^[2],该病通常只引起 1~2 个枝蔓枯死,偶见全株枯死,而据我们田间调查观察,在浙江临安“心香”品种上发生的甘薯茎腐病常引起全株枯死,在甘薯生产后期感染的偶见 1~2 个枝蔓枯死。致病性试验结果表明:在室温高湿条件下,接种后 2~3d 即出现症状,这与田间观察的结

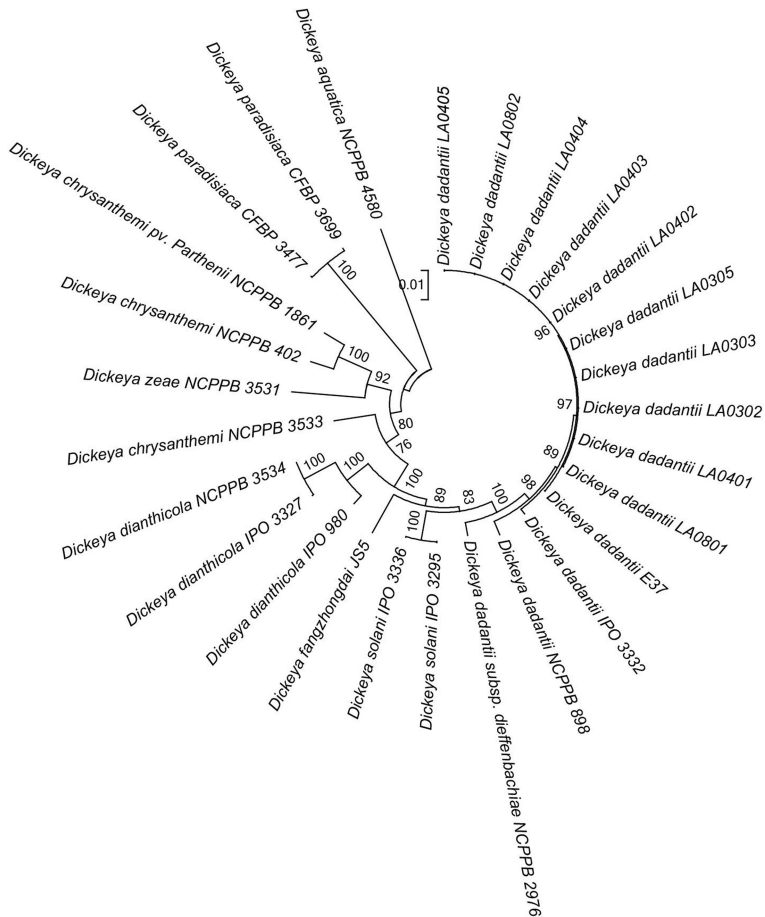


Fig. 2 Bootstrap consensus tree of concatenated sequences of *rplB*, *recA*, *purA*, *gapA*, *fusA*, *dnaX*, *rpoS* and *gyrA* sequences of 27 members of the genus *Dickeya* belonging to different species

The NJ method was used as a heuristic method to improve the likelihood of the tree.

Bootstrap percentages were calculated with 1 000 replicates.

果是一致的,在田间连续阴雨后 2~3 d,即出现大面积萎蔫症状。常见细菌病害特征:产生菌脓,如水稻白叶枯病、水稻细菌性条斑病、梨火疫病;用手挤压茎维管束,可见白色的菌脓溢出,如番茄青枯病;腐烂型细菌病害有臭味,如大白菜软腐病。甘薯茎腐病在田间或接种试验都没有观察到菌脓现象,折断病茎不用手挤压即可见白色汁液,但不能等同于菌脓,因折断正常的甘薯茎蔓、叶柄都可见白色汁液,发病初期没有臭味,发病后期腐烂时有臭味。

通过对甘薯茎腐病菌的菌体形态和培养特性观察, Biolog 测定、脂肪酸分析、16S rDNA 序列分

析、MALDI-TOF 质谱鉴定和 *dnaX*、*rplB*、*fusA*、*gapA*、*gyrA*、*purA*、*recA*、*rpoS* 等 8 个看家基因的序列系统发育分析,明确引起浙江甘薯茎腐病的病原菌为达旦提狄克氏菌 *Dickeya dadantii*。目前,细菌分类鉴定的方法或系统有多种,具体采用何种方法因菌而异。通常采用基于 95 种碳源的利用情况而研制的 BIOLOG 微生物鉴定系统,基于特定脂肪酸组成特性而研制的 GC-FAME 微生物鉴定系统,基于每种微生物都有自身独特的蛋白质特征指纹图谱而研制的 MALDI-TOF 质谱微生物鉴定系统,通过测定比较 16S rDNA 序列而进行的分子生物学鉴定等方法。细菌分类鉴定必须同时使用几种方法

或系统全面鉴定,表型鉴定和分子生物学鉴定结合对未知菌进行准确合理定位。如本实验中,Biolog 鉴定结果和 FAME 鉴定结果,供测定的本实验室分离的菌株都不是 *D. dadantii*,因这二个鉴定系统中没有 *D. dadantii* 标准菌株的相关信息;MALDI-TOF 质谱鉴定结果都是达旦提狄克氏菌 *D. dadantii*; 16S rDNA 序列测定比对结果是:分别与这 10 株致病菌 16S rDNA 序列同源性达到 99% 的有 *D. dadantii*、“以往”*E. chrysanthemi*、*D. aquatica*、*D. dianthicola*、*D. chrysanthemi*、*D. dadantii* subsp. *dieffenbachiae*、*Cedecea neteri* 和 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* 等多种细菌,目标菌属于哪一种无法确定,基于“以往”菊欧文氏菌 *E. chrysanthemi* 的 ITS 序列设计的特异性引物^[19,20],能扩增出特异性片段的菌只能说明是“以往”菊欧文氏菌或者是 *Dickeya* 属的菌,只能作为 *D. dadantii* 的辅助鉴定方法,因此,对 *D. dadantii* 的鉴定必须结合其他方法。国内已有多人对甘薯茎腐病病原进行了研究^[5~7,21],都是基于 16S rDNA 序列的测定比对,鉴定为“以往”*E. chrysanthemi*^[5,6,21]或 *D. dadantii*^[7]。因为 *Dickeya* 属种的同源性很高,国际上对该属种的鉴定均采用测定分析看家基因的序列并与属内种标准菌株的相应序列系统比较的方法^[9~11,22],本研究首次对国内发生的甘薯茎腐病病原菌进行了深入系统的鉴定。

参考文献

- [1] Martin W J, Dukes P D. A bacterial soft rot of sweet potato plants [J]. Proceedings American Phytopathological Society, 1975, 2(1): 57.
- [2] Schaad N W, Brenner D A. Bacterial wilt and root rot of sweet potato caused by *Erwinia chrysanthemi* [J]. Phytopathology, 1977, 67(3): 302-308.
- [3] Tamura I, Azegami K, Miura T, et al. Bacterial stem and root rot of sweet potato caused by *Erwinia chrysanthemi* [J]. Annals Phytopathological Society of Japan, 1998, 64(4): 376.
- [4] Varela G, Hernández Y, Trujillo G. Bacterial stem rot of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) caused by *Erwinia chrysanthemi* in Maracay, Aragua state, Venezuela [J]. Revista De La Facultad De Agronomía Universidad Central De Venezuela, 1999, 25(1): 29-39.
- [5] Huang L F, Luo Z X, Fang B P, et al. A new bacterial stem and root rot disease of sweet potato in Guangdong, China (in Chinese) [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 2011, 41(1): 18-23.
- [6] Qin S Y, Huang L F, Ge C B, et al. Molecular identification of a new bacterial stem rot disease of sweet potato in Henan (in Chinese) [J]. Crops (作物杂志), 2013, (6): 52-55.
- [7] Gao B, Wang R Y, Ma J, et al. Preliminary study on bacterial stem and root rot disease of sweet potato in Hebei Province (in Chinese) [J]. Plant Protection (植物保护), 2015, 41(3): 119-122.
- [8] 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 zae* sp. nov. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(4): 1415-1427.
- [9] 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(7): 2264 - 2266.
- [10] Van der Wolf J M, Nijhuis E H, Kowalewska, 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(Pt3): 768-774.
- [11] Tian Y L, Zhao Y Q, Yuan X L, et al. *Dickeya fangzhongdai* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from pear tree (*Pyrus pyrifolia*) [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(8): 2831-2835.
- [12] Brady C L, Cleenwerck I, Denman S, et al. Proposal to reclassify *Brenneria 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(Pt7): 1592-1602.
- [13] John M, Stephane G, Shimpei M, *et al.* Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology [J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(6): 614-629.
- [14] Schaad N W, Jones J B, Chun W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria [M]. 3rd Edition. Minn: American Phytopathological Society, 2001: 5-6.
- [15] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [16] Waleron M, Waleron K, Podhajska A J, *et al.* Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment [J]. Microbiology, 2002, 148(2): 583-595.
- [17] Waleron M, Waleron K, Lojkowska E. Genotypic characterisation of the *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of *rpoS* gene [J]. Plant Protection Science, 2002, 38(S2): 288-290.
- [18] Ślawiak 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.
- [19] Liu P, Huang G M, Liu Y, *et al.* Molecular detection of *Erwinia chrysanthemi* (in Chinese) [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 2007, 37(6): 584-587.
- [20] Smid E J, Jansen A J, Gorris L M. Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia chrysanthemi* in potato tubers using polymerase chain reaction [J]. Plant Pathology, 1995, 44(6): 1058-1069.
- [21] Huang L F, Fang B P, Luo Z X, *et al.* First report of bacterial stem and root rot of sweet potato caused by a *Dickeya* sp. (*Erwinia chrysanthemi*) in China [J]. Plant Disease, 2010, 94(12): 1503.
- [22] Glorimar M, Kevin L S, Daniel M J, *et al.* Phylogeny and classification of *Dickeya* based on multilocus sequence analysis [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63(Pt9): 3524-3539.

责任编辑:曾晓葳