

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (10) :1253 – 1263; 4 October 2015  
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicroen  
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20150033

## 北京地区油菜软腐病病原菌的鉴定

胡娜娜<sup>1</sup>, 李超<sup>2</sup>, 王茜<sup>1</sup>, 邵菁芑<sup>1</sup>, 刘彦泉<sup>3</sup>, 赵亮<sup>1</sup>, 马荣才<sup>1</sup>, 谢华<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>北京农业生物技术研究中心, 北京市农林科学院, 北京 100097

<sup>2</sup>北京市大兴区农业技术示范站, 北京 102615

<sup>3</sup>北京市大兴区种植业服务中心, 北京 102600

**摘要:**【目的】确定引发北京地区油菜 [*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *communis* Tsen et Lee] 软腐病的病原。【方法】结合病原菌形态、BIOLOG 及生理生化、16S rRNA 基因序列及亚种 IGS 区特征分析, 对从北京大兴和通州区油菜软腐病样中病原菌进行生物学鉴定。【结果】分离的 40 个菌株均能引发油菜软腐病, 但分别为胡萝卜果胶杆菌 (*Pectobacterium carotovorum*) 的 2 个不同亚种, 其中 13 株为 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*), 另 27 株为 *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (*Pcb*)。接种白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) 致病力测定分析表明, 亚种内、来源相同与 16S rRNA 基因序列相同的菌株间均存在明显的致病力分化。【结论】*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 和 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* 是引发北京地区油菜软腐病的致病菌, 后者为首次报道能引起白菜类蔬菜软腐病的常见致病菌。

**关键词:** 油菜 [*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *communis* Tsen et Lee], 软腐病, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (*Pcb*), 致病性

中图分类号: Q939 文章编号: 0001-6209 (2015) 10-1253-11

植物细菌性软腐病的大部分病原物可归为解果胶肠杆菌 (*Pectinolytic Enterobacteriaceae*), 之前分属于欧文氏属 (*Erwinia*) 2 个种胡萝卜欧文氏菌 (*Erwinia carotovora*) 和菊欧文氏菌 (*Erwinia chrysanthemi*), 系统发育分析将这两个种分别提升到 *Pectobacterium* 和 *Dickeya* 新属的水平<sup>[1-2]</sup>。表型特征、DNA-DNA 杂交、血清学和 16S rDNA 序列分析, 又将某些 *E. carotovora* 亚种提升到种水平<sup>[3]</sup>, 这样 *Pectobacterium* 属包括 4 个种 *P. carotovorum*、*P.*

*atrosepticum*、*P. betavascolorum* 和 *P. wasaliae*, 它们能侵染不同的宿主植物并有宿主特异性<sup>[4]</sup>。其中 *P. carotovorum* 又被进一步划分为 3 个亚种 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*)、*P. carotovorum* subsp. *odoriferum* (*Pco*) 和 *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* (*Pcb*)<sup>[5]</sup>。*Pco* 最早报道为能引起法国菊苣的软腐病, 此后对该亚种报道较少<sup>[6-7]</sup>。*Pcc* 是自然条件下普遍存在的植物病原菌, 而且其寄主范围和地理分布最为广泛, 能侵染数百种蔬菜以及某

基金项目: 现代农业产业技术体系北京市叶类蔬菜创新团队建设专项资金资助

\* 通信作者。Tel: +86-10-51503832; Fax: +86-10-51503980; E-mail: xiehua@baafs.net.cn

作者简介: 胡娜娜 (1989 -), 女, 河北沧州人, 硕士研究生。主要研究方向为植物保护学。E-mail: 1045522453@qq.com

收稿日期: 2015-01-19; 修回日期: 2015-03-18

些花卉植物<sup>[8]</sup>。而 *Pcb* 最早报道能引起马铃薯黑胫病和软腐病<sup>[9-10]</sup>, 此后也报道其能引起西椒、胡萝卜和万年青植物的软腐病<sup>[11]</sup>。

油菜 [*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *communis* Tsen et Lee] 属十字花科芸薹属, 具有光滑和深绿色叶柄, 为不结球白菜类, 也通称为青菜或小白菜, 是北京市地区主要种植的叶类蔬菜之一。根据 2009 年和 2010 年北京市农业局提供的数据, 北京市油菜年种植面积分别为 53669.6 和 51591.7 亩。2012 和 2013 年 6-8 月对所占北京地区种植面积近 60% 的大兴和通州区油菜生产状况调查中发现, 软腐病是影响夏季油菜产量的重要毁灭性病害, 其爆发速度快, 发病严重, 分布范围广, 宿主范围大, 且难以用药剂进行有效的防治。本研究为明确北京地区油菜软腐病的病原, 从北京大兴及通州区油菜软腐病病株中分离并鉴定软腐致病菌, 以了解京郊地区油菜软腐病菌的遗传多样性, 为进一步开展对该病害的综合控制技术奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

结晶紫果胶酸盐 (CVP)、蔗糖、麦芽糖、山梨醇、阿拉伯醇、异麦芽酮糖、 $\alpha$ -甲基葡萄糖苷购自 SIGMA 公司; 柠檬酸盐购自 AMRESCO 公司; 细菌 DNA 提取试剂盒 (Bacterial DNA Kit D3350) 购自 OMEGA 公司; 2.5 U Fast Pfu DNA polymerase 购自 TRANSGEN 公司; pGEMT-Easy 购自 PROMEGA 公司; 0.25 U *Taq* DNA polymerase 购自 TaKaRa 公司。BIOLOG 微生物自动化鉴定系统: 美国 BIOLOG 公司 (Haywood, CA, USA)。

### 1.2 菌株来源

将 2013 年 6 月至 8 月从通州和大兴区采集到的油菜 (华冠) 软腐病病样迅速送到实验室超净台中分离。用灭菌剪刀剪取发病植株病健交界处的小块组织, 于 75% 酒精中消毒 30 s 至 1 min, 无菌水清洗 3 次后, 移入 1-3 mL 无菌水中, 剪碎或研碎, 静置 5-10 min, 使细菌从破碎的植物组织中溢入无菌水中。用灭菌接种环直接蘸取少量菌悬液在 LB 平板上划线培养。于 28 °C 培养箱中倒置培养 16-18 h 后挑取 LB 平板上的单菌落经过 5-6 次转接纯化后, 用牙签挑取单菌落点入 CVP 培养基上培养

1-7 d, 挑取结晶紫果胶酸盐 (crystal violet pectate, CVP) 选择性培养基上产生杯状凹陷中心的菌落并经 5-6 次转接纯化, 于液体 LB 培养基中培养 16-18 h, 用无菌 0.9% NaCl 生理盐水洗涤 3 次后, 配制成  $2 \times 10^8$  CFU/mL 的菌悬液。选用健康油菜华冠品种叶柄基部接种分离获得致病菌, 保存于 -80 °C 冰箱中备用。同等条件下, 设无菌 0.9% NaCl 生理盐水为对照。

### 1.3 致病力测定

选用健康油菜和大白菜叶柄基部用于致病性分析。40 个待测菌株于液体 LB 培养基中培养 16-18 h, 用无菌 0.9% NaCl 生理盐水洗涤 3 次后, 配制成  $2 \times 10^8$  CFU/mL 的菌悬液。将油菜和白菜叶柄基部切为 5 cm 左右边长的正方形, 75% 酒精擦拭消毒后, 下衬 2 层无菌滤纸, 置于无菌培养皿中, 并加入 3 mL 无菌水保持湿度。用灭菌小刀在其中划 4 mm  $\times$  4 mm 的十字型伤口, 深度为 2 mm, 将 10  $\mu$ L 用无菌 0.9% NaCl 生理盐水配制成  $2 \times 10^8$  CFU/mL 的菌悬液加入到其中, 每个菌株重复 10 次。用封口膜将培养皿口封住, 于 28 °C 培养。同等条件下, 设无菌 0.9% NaCl 生理盐水侵染的植物组织为对照。接种 24 h 时测量病斑的长度 (cm) 并取其平均值作为平均病斑长度。分级标准为: 小于 1 cm 为致病能力低, 1-3 cm 为致病能力中等, 3 cm 以上为致病能力高。

### 1.4 菌株形态及生物化学特性分析

菌落形态、革兰氏染色和鞭毛染色及柠檬酸盐分解、37 °C 生长测定参考《植病研究方法》(第 3 版)<sup>[12]</sup>。病原菌对蔗糖、麦芽糖、山梨醇、阿拉伯醇、异麦芽酮糖和  $\alpha$ -甲基葡萄糖苷的利用实验参考《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 8 版) 和《植病研究方法》(第 3 版)<sup>[6, 9, 12-13]</sup>。用 GEN III BIOLOG 微孔板 (BIOLOG 公司) 测定菌株对 95 种碳源的利用 (BIOLOG 公司)。将保存于 -80 °C 冰箱中菌株于 LB 平板上活化培养, 挑单菌落于 BUG 培养基上划线并于 24 °C 下富集培养 24 h。用无菌棉签沾取富集后的细菌至加有 20 mL IF-A 培养液的反应管中 (BIOLOG 公司) 并调节浊度至 90%-98%。将含有菌体的接种液倒入无菌微型槽中, 利用八道电动移液器 (BIOLOG 公司), 将菌悬液接种至 GEN III 型微平板中。微平板中每个微孔内接种 100  $\mu$ L 菌悬液。置于 28 °C 培养箱中培养。培养 24 h 时利用

ML3-DC 软件进行读数并保存数据。选用本实验室保存的软腐病致病菌 BC1 (*Pcb*)、S7 (*Pco*)、ECC71 (*Pcc*) 为对照菌株。

## 1.5 16S rRNA 基因片段的扩增和序列分析

**1.5.1 基因组 DNA 的提取:** 将保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱的菌株划线并于  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养箱中倒置培养过夜, 挑取单克隆于液体 LB 培养基在  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  下培养 16–18 h。细菌全基因组 DNA 的提取使用 Bacterial DNA Kit D3350 (OMEGA) 试剂盒。取  $1\text{ }\mu\text{L}$  DNA 溶液于 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 并于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.5.2 16S rRNA 片段的扩增:** 将 GenBank 数据库中 *Pc*、*Pa*、*Pb* 和 *Pw* 菌株的 16S rRNA 基因完整序列进行比对, 根据一致性序列的侧翼区域, 设计了包含基因完整序列的 16S rRNA 引物 Pe1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 Pe2 (5'-AGGTGATCCAACCGCAGTT-3')。将保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中 40 个待测菌株分别划线接种于 LB 固体培养基上,  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 18 h, 挑取单克隆于  $100\text{ }\mu\text{L}$  灭菌  $\text{ddH}_2\text{O}$  中,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  裂解细胞 10 min,  $10000\times g$  离心 5 min 去除细胞碎片, 分别取  $2.5\text{ }\mu\text{L}$  上清液作为模板进行 PCR 扩增。每个菌株 PCR 反应体系均为  $50\text{ }\mu\text{L}$ , 还包括  $0.2\text{ mmol/L}$  dNTP、分别  $0.2\text{ }\mu\text{mol/L}$  Pe1 和 Pe2 引物、 $1\times$  buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  plus) 和  $2.5\text{ U}$  Fast Pfu DNA polymerase (TRANSGEN 公司)。PCR 反应条件:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  2 min;  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  20 s,  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  20 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min。回收约 1.5 kb 大小 PCR 产物, 将其连接到 pGEMT-Easy (PROMEGA 公司) 载体上, 转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  感受态细胞中。重组质粒经 *Not* I 酶切和 PCR 鉴定正确后, 送交中美泰和生物技术公司测序。

## 1.6 16S rRNA 序列系统发育树构建

利用 MEGA 5.05 软件中 Clustal W, 将获得的菌株 16S rRNA 基因完整序列在 NCBI 中进行 BLAST 分析, 并以 *Dickeya dadantii* strain 582 为外组, 选用 UPGMA 法将 NCBI 中发表的 27 个果胶杆菌菌株 (包括 6 个 *Pcc*、11 个 *Pcb*、5 个 *Pco*、3 个 *Pw*、2 个 *Pa* 和 1 个 *Pb*) 16S rRNA 基因用于系统发育树的构建。

## 1.7 *Pcb* 亚种特异引物扩增 IGS 区基因

*Pcb* 特异性引物 BR1f (5'-GCGTGCCGGGTTT ATGACCT-3') 和 L1r (5'-CA (A/G) GGCATCCACC GT-3') 用于扩增 40 个菌株部分 16S-23S rDNA 基因间隔

区 (intergenic spacer, IGS)<sup>[9]</sup>。  $10\text{ }\mu\text{L}$  PCR 反应体系中包括  $0.2\text{ mmol/L}$  dNTP、分别  $0.2\text{ }\mu\text{mol/L}$  BF 和 BR 引物、 $1\times$  Buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  plus) 和  $0.25\text{ U}$  *Taq* DNA polymerase (TaKaRa), 及  $1\text{ }\mu\text{L}$  上清液模板 (参照材料与方法中 1.3)。PCR 反应条件:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $62\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s, 35 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min。以  $100\text{ bp plus}$  Marker 为对照, 取  $10\text{ }\mu\text{L}$  PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色观察是否有特异性条带产生。选用本实验室保存的果胶杆菌致病菌 BC1 (*Pcb*)、ECC71 (*Pcc*) 为对照菌株。

## 2 结果和分析

### 2.1 软腐病菌的分离和致病性测定

从油菜软腐病样中分离的菌株经 CVP 选择性培养基筛选 (图 1-A), 将在 CVP 培养基上产生杯状凹陷的菌株, 回接到宿主油菜华冠品种上。致病菌接种油菜组织从伤口处开始产生水渍状病变, 并从伤口处迅速扩散, 24 h 后病情发展到离体叶柄整块组织基本完全腐烂, 活体叶柄组织腐烂瘫倒 (图 1-B, C), 其症状与田间采集的油菜软腐病样症状 (图 1-D) 一致。对接种发病的油菜组织重新分离病原菌, 得到 40 个均能引起油菜腐烂的菌株。

### 2.2 软腐病菌形态及生物化学特性分析

40 个分离的菌株在 LB 培养基上均形成约  $1.0\text{--}1.5\text{ mm}$  乳白色稍突起的圆形菌落, 菌落凸起, 表面光滑, 边缘整齐清晰。各菌株的菌落形态无明显差异。具有 2–8 根周生鞭毛, 菌体两端钝圆呈短杆状, 大小为  $(0.5\text{--}0.7)\text{ }\mu\text{m}\times(1.0\text{--}2.0)\text{ }\mu\text{m}$ , 形状为圆或短杆状 (图 2-A); 革兰氏染色阴性 (图 2-B)。形态特征符合软腐菌的描述。

所有测试菌株及对照菌株 BC1 (*Pcb*)、S7 (*Pco*)、ECC71 (*Pcc*) 均能够在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下培养基中生长和分解柠檬酸盐, 不同于 *P. atrosepticum* 和 *P. wasaliae* 菌株不能够在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下生长, 又有别于 *P. betavascularum* 菌株不能利用柠檬酸盐的特性, 与胡萝卜软腐果胶杆菌 *P. carotovorum* 菌株特性相符<sup>[3,6]</sup>。不同于对照菌株 S7, 而与对照菌株 BC1 和 ECC71 一致, 测试的 40 个菌株均不能利用 D-山梨醇; 除了极少数 (1–3 个) 菌株能微弱利用外, 其余菌株也均不能利用麦芽糖、阿拉伯醇、异麦芽酮糖和  $\alpha$ -甲基葡萄糖苷。15 株菌也表现出了利用蔗糖的能

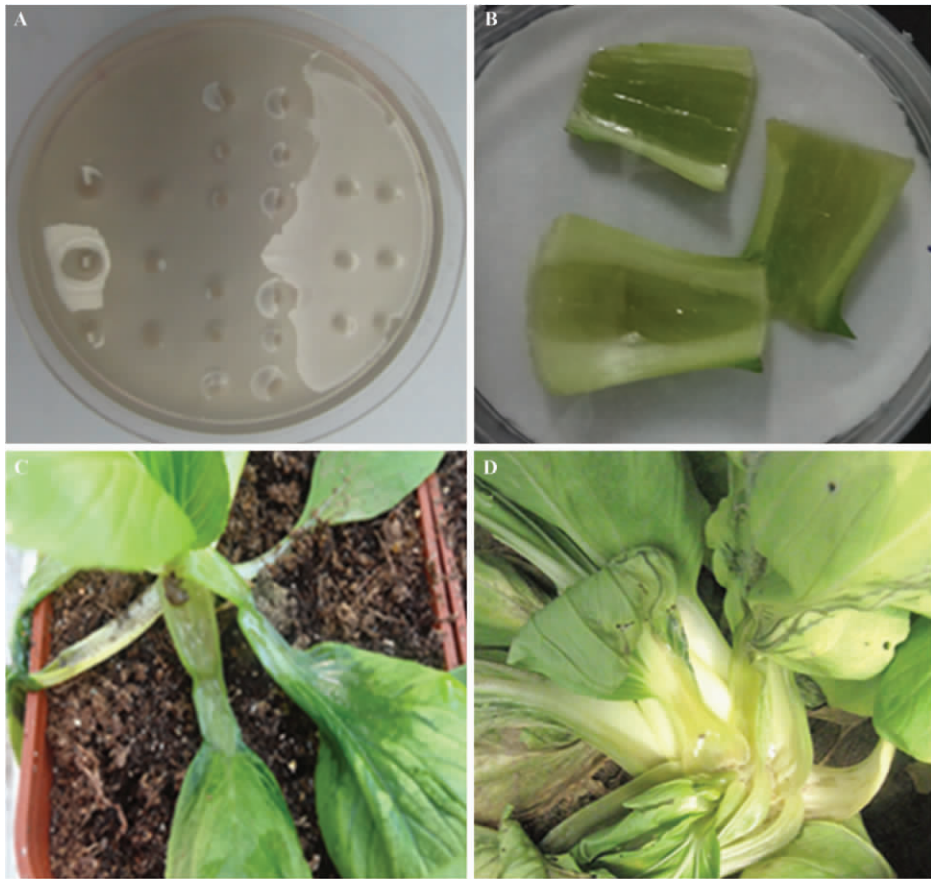


图 1. 菌株在 CVP 平板上产生杯状凹陷 (A), 接种 24 h 后离体和活体接种症状 (B, C) 及油菜软腐病田间症状 (D)  
Figure 1. Cavities formed on CVP agar (A) and *in vitro* and *in vivo* inoculation after 24 h (B, C), and soft rot symptoms of cabbage field (D).

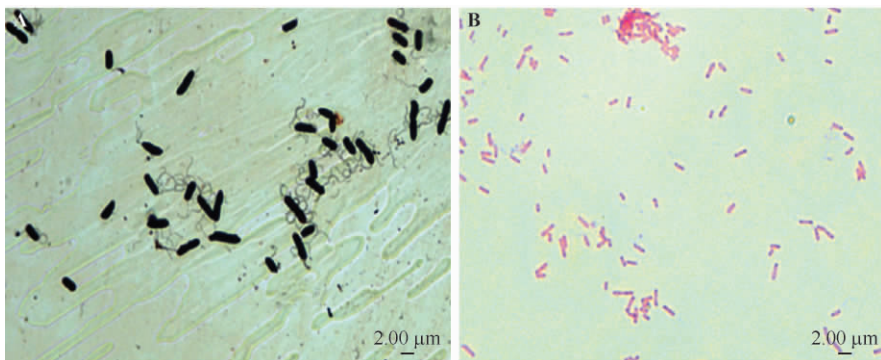


图 2. 菌株 (Y01) 鞭毛染色 (A) 和革兰氏染色 (B)

Figure 2. Flagella (A) and gram staining (B) under optics microscope (1000 ×) of strain Y01 isolated from Tongzhou.

力 (表 1)。由于 BIOLOG 微生物自动化鉴定系统内仅收录了 *Pectobacterium* 属中 *Pcc* 亚种和 *Pa* 种数据, GEN III 微平板中 71 种碳源和 23 种化学物质的利用分析结果显示, 40 个菌株及 3 个对照菌株均为 *Pcc* 亚种。

### 2.3 16S rRNA 的序列分析及系统发育树构建

40 个菌株与对照 BC1、S7 和 ECC71 的 16S rRNA

基因 PCR 扩增均得到一条大小约为 1.5 kb 的产物, 经测序确定为 16S rRNA 基因的完整序列 (GenBank 登录号为 KP187484-KP187523)。BLAST 分析结果显示, 40 个菌株与已发表 *Pcb* 和 *Pcc* 序列相似性均在 98% 以上。基于 16S rRNA 基因完整序列, 以 *D. dadantii* 菌株 582 为外组, 将 40 个菌株与已发表的 27 株软腐菌菌株构建系统发育树 (图 3)。结果显示, 本

研究分离得到的 40 个菌株与已发表的 *Pcc* 和 *Pcb* 组成的类群及已发表的 *Pco* 菌株形成的类群构成了明显的 *Pc* 分枝。*Pa* 和 *Pb* 菌株共同组成的类群与 *Pw* 菌株组成的类群也聚集形成另外分枝。

表 1. 40 个菌株的生理生化特征

Table 1. Physiological and chemical characteristics of the 40 strains

Number	Strains	Growth at 37 °C	Utilization of citrate	Acid production from sucrose	Acid production from D-maltose	Acid production from D-sorbitol	Acid production from D-arabitol	Acid production from isomaltulose	Acid production from $\alpha$ -methyl glucoside
1	Y01	+	+	-	-	-	-	-	-
2	Y02	+	+	-	-	-	-	-	-
3	Y03	+	+	-	-	-	-	-	-
4	Y05	+	+	-	-	-	-	-	-
5	Y06	+	+	-	-	-	-	-	-
6	Y07	+	+	+	-	-	-	-	-
7	Y08	+	+	-	-	-	-	-	W +
8	Y11	+	+	-	-	-	-	-	-
9	Y12	+	+	-	-	-	-	-	-
10	Y13	+	+	-	-	-	-	-	-
11	Y14	+	+	-	-	-	-	W +	-
12	Y15	+	+	+	-	-	-	-	-
13	Y16	+	+	+	W +	-	-	-	-
14	Y18	+	+	-	-	-	-	-	-
15	Y21	+	+	+	-	-	-	-	-
16	Y24	+	+	-	-	-	-	W +	-
17	Y29	+	+	-	-	-	-	-	-
18	Y31	+	+	+	-	-	-	-	W +
19	Y32	+	+	-	-	-	-	-	-
20	Y33	+	+	+	-	-	-	-	-
21	Y34	+	+	+	-	-	-	W +	-
22	Y35	+	+	+	-	-	-	-	-
23	Y36	+	+	+	-	-	-	-	-
24	Y39	+	+	-	-	-	-	-	-
25	Y40	+	+	-	-	-	-	-	-
26	Y44	+	+	+	-	-	-	-	-
27	Y45	+	+	+	-	-	-	-	-
28	Y46	+	+	+	-	-	-	-	-
29	Y47	+	+	-	-	-	-	-	-
30	Y49	+	+	-	-	-	-	-	-
31	Y52	+	+	+	-	-	-	-	-
32	Y53	+	+	+	-	-	-	-	W +
33	Y54	+	+	-	-	-	-	-	-
34	Y55	+	+	+	-	-	-	-	-
35	Y57	+	+	-	W +	-	W +	-	-
36	Y58	+	+	-	-	-	-	-	-
37	Y60	+	+	+	-	-	-	-	-
38	Y62	+	+	-	-	-	-	-	-
39	Y64	+	+	-	-	-	-	-	-
40	Y65	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Pcc</i>	ECC71	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Pcb</i>	BC1	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Pco</i>	S7	+	+	+	+	+	+	+	+

+, positive reaction; -, negative reaction; W +, weak positive.

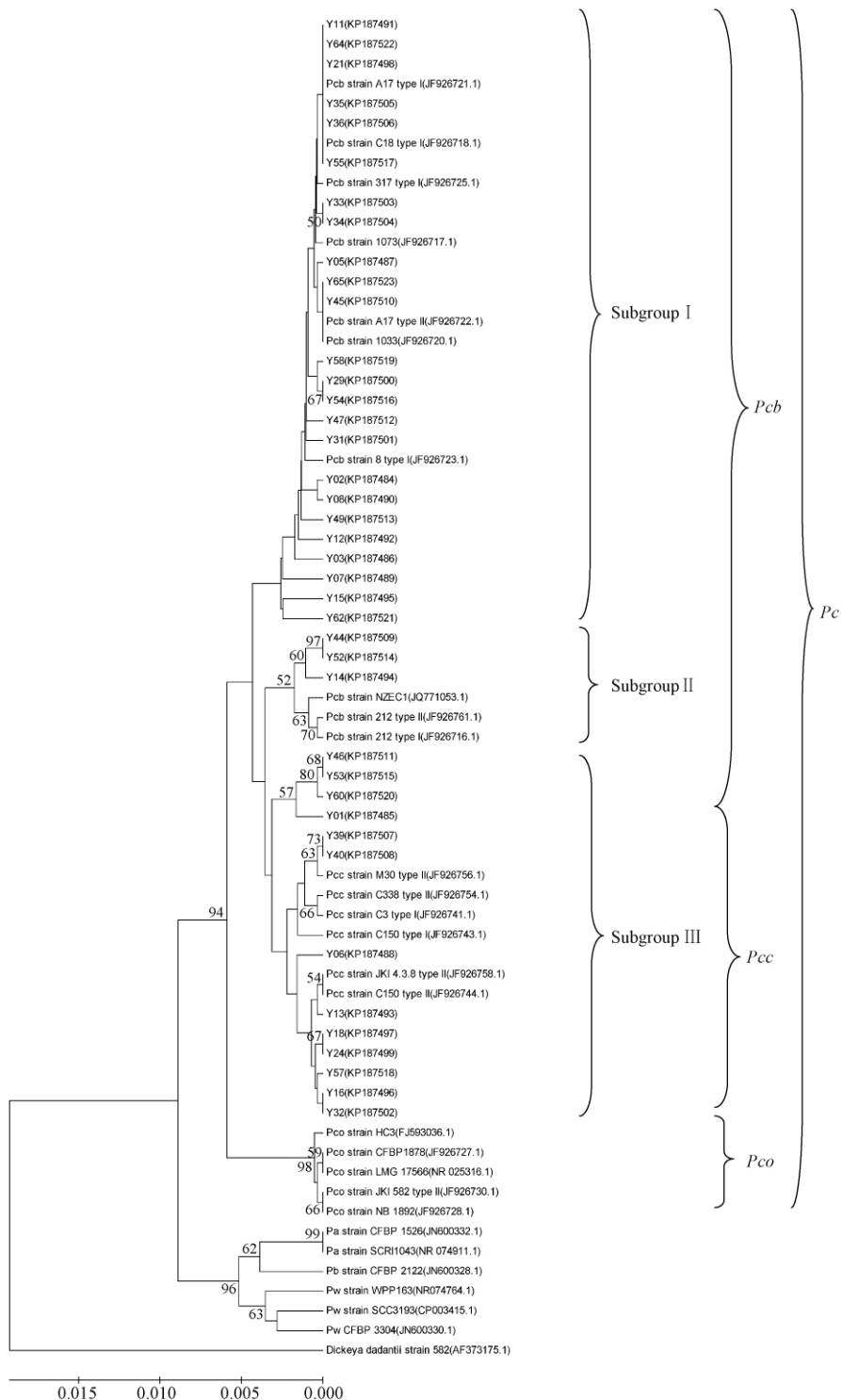


图 3. 40 个菌株与其他菌株的 16S rRNA 基因序列系统发育树

Figure 3. Phylogenetic tree based on the complete 16S rRNA gene sequences of the 40 strains with those of the other *Pectobacterium* strains (*Dickeya dadantii* strain 582 as out group, *Pcc*, *Pcb* and *Pco* are three different subspecies. Among these subgroup I and subgroup II belongs to *Pcb* subspecies, while subgroup III belongs to *Pcc* subspecies). Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, the genetic distance of evolutionary branches.

## 2.4 *Pcb* 亚种特异性引物扩增 IGS 区基因

用 *Pcb* 特异性引物 BR1f 和 L1r 扩增 40 个菌株及其对照菌株。在系统进化树中与已发表的 *Pcb* 菌株 A17 (type I 和 II)、C18 (type I)、317 (type I)、1073、1033 和 8 (type I) 聚集的亚类群 I 中的 24 个菌株及与已发表的 *Pcb* 菌株 212 (type I 和 II) 和 NZEC1 聚集的亚类群 II 中的 3 个菌株及对照菌株

BC1 (*Pcb*) 中均扩增得到一条大约 300 bp *Pcb* 特异条带;而在与已发表的 *Pcc* 菌株 M30 (type II)、C338 (type II)、C3 (type I)、C150 (type I 和 II) 和 JKI 4.3.8 (type II) 聚集的亚类群 III 中的 13 个菌株及对照菌株 ECC71 (*Pcc*) 中均没有得到扩增产物(图 4)。可见,在 40 个菌株中有 13 个菌株鉴定为 *Pcc*, 另 27 个鉴定为 *Pcb*。

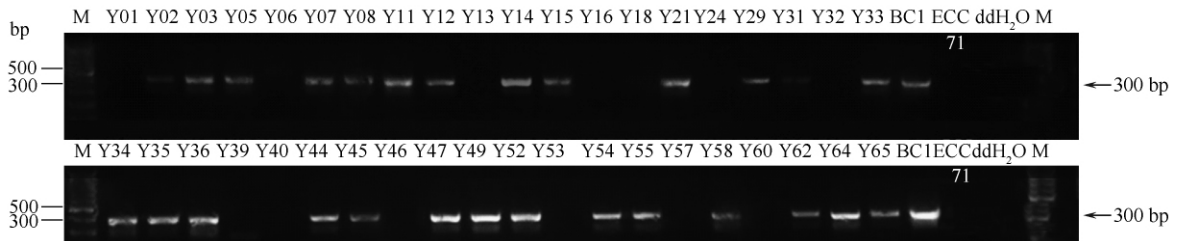


图 4. 40 个菌株 *Pcb* 特异性引物 PCR 扩增产物

Figure 4. The PCR products of the *Pcb* specific-primers PCR amplification in the 40 strains. ECC71, BC1 and ddH<sub>2</sub>O as controls.

## 2.5 软腐病菌致病力测定

由于 24 h 时大部分油菜组织均全部腐烂或大部分腐烂,不能很好地区分较强弱致病菌之间的致病性差异,因此本研究以大白菜叶柄基部接种病原菌产生的病斑大小作为细菌致病力的测定。白菜叶柄基部十字型伤口接种,24 h 时统计病斑长度,发现 40 个菌株存在明显的致病力差异。按病斑长度划分为低、中和高等致病力(图 5)。低和中之间、中和高致病力之间表现为极显著差异( $P$  值分别为  $1.35E-10$  和  $1.75E-06$ )。Y11、Y03、Y29、Y65、Y31、Y36 和 Y39 在接种 24 h 时表现出高致病力,而 Y52、Y45、Y62、Y14、Y64、Y49、Y57 和 Y01 则表现出低致病力,其中 Y52、Y45 和

Y57 尚未发病。亚种内菌株致病力之间存在着差异,如在 *Pcb* 菌株中,接种 24 h 时表现高致病力的 Y11、Y03、Y29、Y65、Y31 和 Y36 和尚未发病的 Y52 和 Y45;在 *Pcc* 菌株中,接种 24 h 时表现高致病力的 Y39 和尚未发病的 Y57。来自同一地区菌株致病力差异也较大,如来源大兴区青云店镇小张本庄村菌株 Y29 接种 24 h 表现高致病力,而菌株 Y52 和 Y45 则尚未发病。16S rRNA 基因相似性为 100% 菌株致病力也存在明显差异,如在 *Pcb* 菌株中接种 24 h 未发病的 Y45 和高致病力的 Y65、*Pcc* 菌株中致病力的 Y40 和高致病力的 Y39 (表 2),这些结果暗示在果胶杆菌中许多致病力因子是菌株特异的。

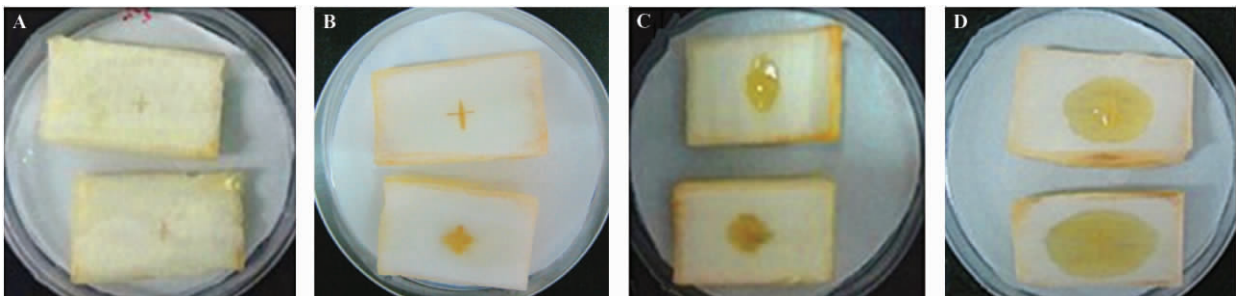


图 5. 接种白菜致病力的差异分级

Figure 5. Disease rank standards on cabbage. A: sterile 0.9% NaCl saline as controls; B: low pathogenic level; C: middle pathogenic level; D: high pathogenic level.

表 2. 用于本研究的 40 个 *Pc* 菌株采集地及致病力等级Table 2. Collection sites and pathogenicity levels of the 40 *Pc* strains used in this study

Strains	Location	Average length of disease spot/cm	Pathogenic level*	
<i>Pcb</i>	Y52	Xiaozhangbenzhuang, Qingyundian, Daxing District (大兴区青云店镇小张本庄村)	0	L
	Y45	Xiaozhangbenzhuang, Qingyundian, Daxing District (大兴区青云店镇小张本庄村)	0	L
	Y62	Nanpuzhou, Changziying, Daxing District (大兴区长子营镇南浦州村)	0.133	L
	Y14	Nanpuzhou, Changziying, Daxing District (大兴区长子营镇南浦州村)	0.267	L
	Y64	Nanpuzhou, Changziying, Daxing District (大兴区长子营镇南浦州村)	0.583	L
	Y49	Xiaozhangbenzhuang, Qingyundian, Daxing District (大兴区青云店镇小张本庄村)	0.950	L
	Y58	Xiaozhangbenzhuang, Qingyundian, Daxing District (大兴区青云店镇小张本庄村)	1.250	M
	Y21	Yangfang, Weishanzhuang, Daxing District (大兴区魏善庄镇羊坊村)	1.433	M
	Y54	Xiaozhangbenzhuang, Qingyundian, Daxing District (大兴区青云店镇小张本庄村)	1.433	M
	Y47	Xiaozhangbenzhuang, Qingyundian, Daxing District (大兴区青云店镇小张本庄村)	1.783	M
	Y15	Beipuzhou, Changziying, Daxing District (大兴区长子营镇北浦州村)	1.833	M
	Y05	Beijing Tongzhou International Seed Technology Park (北京通州国际种业科技园区)	1.967	M
	Y07	Beijing Tongzhou International Seed Technology Park (北京通州国际种业科技园区)	2.033	M
	Y34	Cangshang, Zhangjiawan, Tongzhou District (通州区张家湾镇仓上村)	2.100	M
	Y08	Beijing Tongzhou International Seed Technology Park (北京通州国际种业科技园区)	2.250	M
	Y12	Guoshangpo, Qingyundian, Daxing District (大兴区青云店镇郭上坡村)	2.217	M
	Y02	Beijing Tongzhou International Seed Technology Park (北京通州国际种业科技园区)	2.283	M
	Y55	Xiaozhangbenzhuang, Qingyundian, Daxing District (大兴区青云店镇小张本庄村)	2.533	M
	Y35	Cangshang, Zhangjiawan, Tongzhou District (通州区张家湾镇仓上村)	2.683	M
	Y33	Cangshang, Zhangjiawan, Tongzhou District (通州区张家湾镇仓上村)	2.750	M
Y44	Xiaozhangbenzhuang, Qingyundian, Daxing District (大兴区青云店镇小张本庄村)	2.800	M	
Y11	Guoshangpo, Qingyundian, Daxing District (大兴区青云店镇郭上坡村)	3.000	H	
Y03	Beijing Tongzhou International Seed Technology Park (北京通州国际种业科技园区)	3.017	H	
Y29	Xiaozhangbenzhuang, Qingyundian, Daxing District (大兴区青云店镇小张本庄村)	3.050	H	
Y65	Nanpuzhou, Changziying, Daxing District (大兴区长子营镇南浦州村)	3.067	H	
Y31	Cangshang, Zhangjiawan, Tongzhou District (通州区张家湾镇仓上村)	3.083	H	
Y36	Cangshang, Zhangjiawan Tongzhou District (通州区张家湾镇仓上村)	3.317	H	
<i>Pcc</i>	Y57	Xiaozhangbenzhuang, Qingyundian, Daxing District (大兴区青云店镇小张本庄村)	0	L
	Y01	Beijing Tongzhou International Seed Technology Park (北京通州国际种业科技园区)	0.850	L
	Y40	Cangshang, Zhangjiawan, Tongzhou District (通州区张家湾镇仓上村)	1.069	M
	Y16	Yangfang, Weishanzhuang, Daxing District (大兴区魏善庄镇羊坊村)	1.400	M
	Y32	Cangshang, Zhangjiawan, Tongzhou District (通州区张家湾镇仓上村)	1.583	M
	Y46	Xiaozhangbenzhuang, Qingyundian, Daxing District (大兴区青云店镇小张本庄村)	1.967	M
	Y18	Yangfang, Weishanzhuang, Daxing District (大兴区魏善庄镇羊坊村)	1.983	M
	Y53	Xiaozhangbenzhuang, Qingyundian, Daxing District (大兴区青云店镇小张本庄村)	2.133	M
	Y24	Dazhangbenzhuang, Qingyundian, Daxing District (大兴区青云店镇大张本庄村)	2.167	M
	Y06	Beijing Tongzhou International Seed Technology Park (北京通州国际种业科技园区)	2.300	M
	Y13	Guoshangpo, Qingyundian, Daxing District (大兴区青云店镇郭上坡村)	2.381	M
	Y60	Xiaozhangbenzhuang, Qingyundian, Daxing District (大兴区青云店镇小张本庄村)	2.467	M
	Y39	Cangshang, Zhangjiawan, Tongzhou District (通州区张家湾镇仓上村)	3.383	H

\* L, Pathogenic level is low; M, Pathogenic level is middle; H, Pathogenic level is high.

### 3 讨论

2013年6月至8月期间,从北京油菜主要种植区通州区和大兴区采集的软腐病样中,利用软腐菌在结晶紫果胶酸盐培养基(CVP)上产生杯状凹陷和

回接到宿主油菜上引发软腐致病性鉴定,共分离获得40株油菜软腐菌。形态观察和常用糖醇鉴定以及BIOLÓG微生物自动化鉴定系统分析,并结合16S rRNA基因序列以及IGS区特异性引物PCR分子特征分析,发现引发京郊通州和大兴软腐病致病菌为*P. carotovorum*。因为它们不同于*D. dadantii*



在盐浓度高于 5% 的培养基中不能生长, *Pa* 和 *Pw* 菌株低于 36 - 37 °C 生长特性, 又有别于 *Pb* 菌株不能利用柠檬酸盐的特性, 并且上述特征均与胡萝卜软腐果胶杆菌 *Pc* 相符<sup>[3,6]</sup>。

由于 BIOLOG 微生物自动化鉴定系统内仅收录了 *Dickeya* 及 *Pectobacterium* 属中 *Pcc* 和 *Pa* 数据, 并没有收录 *Pcb* 和 *Pco* 亚种数据, 因而这 40 个软腐菌株均被 BIOLOG 鉴定为 *Pcc* 亚种。在 *Pc* 种内, *Pco* 菌株能够利用蔗糖产生还原物质, 也具备分解麦芽糖、山梨糖醇、阿拉伯糖醇、异麦芽酮糖和  $\alpha$ -甲基葡萄糖苷产酸的能力<sup>[3,6]</sup>。本研究分离的 *Pcc* 和 *Pcb* 都不仅不能利用蔗糖、山梨糖醇和阿拉伯糖醇, 也不能利用异麦芽酮糖和  $\alpha$ -甲基葡萄糖苷碳源。Duarte 等发现的来源于巴西的马铃薯软腐菌 BPBB (*Pcb*) 能够利用或大部分能够利用异麦芽酮糖和  $\alpha$ -甲基葡萄糖苷能力<sup>[9]</sup>。Nabhan 等基于 8 个基因的多位点序列分析技术 (multilocus sequence analysis, MLSA) 将 *Pcb* 分为 I、II 两个类群, 其中类群 I (包括采自叙利亚的菌株 C331 和 C364.2) 与 Duarte 研究结果一致, 具备该亚种典型生理生化特性, 能利用异麦芽酮糖和  $\alpha$ -甲基葡萄糖苷, 而类群 II (采自巴西、美国、以色列、秘鲁, 叙利亚, 德国和日本的 18 株菌株) 不具备该亚种典型菌株这一生理生化特性, 不能够利用  $\alpha$ -甲基葡萄糖苷和蔗糖产生还原物质<sup>[5,18]</sup>, 与本研究 *Pcb* 的生理生化特性一致。*Pcb* 菌株间这种差异是否和菌株来源有关, 还是该亚种菌株间仍存在较大的遗传差异, 仍需要分离更多地区、不同宿主来源的软腐菌来进行验证。

随着分子生物技术的飞速发展, 利用遗传序列特征进行软腐果胶杆菌表型特征无法解决的鉴定问题被越来越多地应用, 其结果也更加准确和可靠。其中, 16S rRNA 序列分析和 PCR 特异性扩增方法成为了最便捷和有效的方法。本研究通过 16S rRNA 基因序列分析, 并结合 *Pcb* 亚种 16S - 23S 基因间隔区 (IGS) 特异性引物扩增将分离到的 40 个软腐菌鉴别为 27 个 *Pcb* 和 13 个 *Pcc* 菌株。16S rRNA 基因完整的序列分析及系统进化树结果将分离得到的 40 个软腐菌与已发表的 *Pc* 菌株共同形成了明显的 *Pc* 分枝, 且在该分枝中与 *Pco* 菌株形成了不同类群; 利用 *Pcb* 亚种 IGS 区特异性引物能在 *Pcb* 菌株中均扩增得到一条大约 300 bp 的 *Pcb* 特异条带, 而 *Pcc* 菌株无扩增产物<sup>[9]</sup>, 将 40 个 *Pc* 菌株区分为 13

个 *Pcc* 和 27 个 *Pcb* 菌株。此外, IGS 区特异性引物扩增方法也可以用于 *Pcc* 亚种的鉴定<sup>[9,18]</sup>。Edward 等报道用 EXPCCF/EXPCCR 特异性引物仅在 *Pcc* 菌株中扩增得到 550 bp 的特异性条带, 而 *Pcb* 中无扩增产物<sup>[19]</sup>。Nabhan 等研究认为 16S rRNA 仅能区分细菌种的差异, 而不能对亚种进行区分<sup>[5]</sup>, 但本研究在 27 个 *Pcb* 菌株中, 有 24 个菌株与已发表的 *Pcb* 菌株聚集成由 *Pcb* 菌株构成的亚类群 I, 另 3 个菌株与其他已发表的 *Pcb* 菌株也聚集成由 *Pcb* 菌株构成的亚类群 II, 而 13 个 *Pcc* 菌株则与已发表的 *Pcc* 菌株聚集成由 *Pcc* 菌株构成的亚类群 III, 而遗传关系相对较远的 *Pco* 菌株单独成群。可见, 基于 16S rRNA 基因序列在一定程度上也能揭示亚种之间的遗传关系。

Andrew 等研究发现菌株的致病力与菌株的遗传及生理生化特征无关, 表明许多致病因子具有菌株特异性<sup>[14]</sup>。本研究致病力鉴定结果发现 40 个菌株存在明显的致病力差异, 亚种内、来源相同与 16S rRNA 基因序列相同的菌株之间也存在明显的致病力分化, 也从不同方面显示出果胶杆菌中许多致病因子是菌株特异的。据以往文献报道, 十字花科芸薹属的白菜类蔬菜细菌性软腐病为 *Pcc* 亚种所引起<sup>[15-17]</sup>。与致病菌 *Pcc* 相比, 本研究结果表明 *Pcb* 为油菜上的更为常见的致病菌, 其在分离到的 40 个致病性菌株中所占比例高于 *Pcc* (27 个 *Pcb* 和 13 个 *Pcc*)。目前没有 *Pcb* 亚种引发白菜类蔬菜软腐病的报道, 这是由于一方面, *Pcb* 亚种于 2004 年才被提出<sup>[9]</sup>, *Pcb* 亚种的资料仍不完善; 另一方面, *Pcb* 与 *Pcc* 亚种生理生化性状和 16S rRNA 序列十分相似, 不易区分<sup>[5]</sup>。因此该研究为后续白菜类蔬菜等抗软腐病品种的筛选及对该病害的综合防治方法的研究奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Hauben L, Moore ERB, Vauterin L, Steenackers M, Mergaert J, Verdonck L, Swings J. Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*. *Systematic and Applied Microbiology*, 1998, 21 (3) : 384-397.
- [2] Samson R, Legendre JB, Christen R, Fischer-Le Saux M, Achouak W, Gardan L. 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 zeae* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55 (4) : 1415-1427.
- [3] Gardan L, Gouy C, Christen R, Samson R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53 (2) : 381-391.
- [4] Pérombelon MCM. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology*, 2002, 51 (1) : 1-12.
- [5] Nabhan S, de Boer SH, Maiss E, Wydra K. Taxonomic relatedness between *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* subsp. nov.. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113 (4) : 904-913.
- [6] Gallois A, Samson R, Ageron E, Grimont PAD. *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera* subsp. nov., associated with odorous soft rot of chicory (*Cichorium intybus* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1992, 42 (4) : 582-588.
- [7] Zhu L, Xie H, Chen S, Ma R. Rapid isolation, identification and phylogenetic analysis of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovora*. *Journal of Plant Pathology*, 2010, 92 (2) : 479-483.
- [8] Toth IK, Bell KS, Holeva MC, Birch PRJ. Soft rot *Erwiniae*: from genes to genomes. *Molecular Plant Pathology*, 2003, 4 (1) : 17-30.
- [9] Duarte V, de Boer SH, Ward LJ, de Oliveira AMR. Characterization of a typical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 96 (3) : 535-545.
- [10] Yap MN, Barak JD, Charkowski AO. Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (5) : 3013-3023.
- [11] Ma B, Hibbing ME, Kim HS, Reedy RM, Yedidia I, Breuer J, Breuer J, Glasner JD, Perna NT, Kelman A, Charkowski AO. Host range and molecular phylogenies of the soft rot *Enterobacterial* genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology*, 2007, 97 (9) : 1150-1163.
- [12] 方中达. 植病研究方法. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [13] Garrity G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2: The Proteobacteria. Berlin: Springer Verlag, 2005.
- [14] Pitman AR, Wright PJ, Galbraith MD, Harrow SA. Biochemical and genetic diversity of pectolytic enterobacteria causing soft rot disease of potatoes in New Zealand. *Australasian Plant Pathology*, 2008, 37 (6) : 559-568.
- [15] Yuan F, Qu SP, Cui CS, Cao MQ, Ma RC. A new strain of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* isolated from soft-rotted Chinese cabbage. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44 (2) : 136-140. (in Chinese)  
远方, 屈淑平, 崔崇士, 曹鸣庆, 马荣才. 一株新的胡萝卜软腐欧文氏菌的分离和鉴定. *微生物学报*, 2004, 44 (2) : 136-140.
- [16] Golkhandan E, Kamaruzaman S, Sariah M, Abidin MAZ, Nasehi A. Characterization of Malaysian *Pectobacterium* spp. from vegetables using biochemical, molecular and phylogenetic methods. *European Journal of Plant Pathology*, 2013, 137 (3) : 431-443.
- [17] Nazerian E, Sijam K, Ahmad ZAM, Vadamalai G. First report of cabbage soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovora* in Malaysia. *Plant Disease*, 2011, 95 (4) : 491.
- [18] Nabhan S, Wydra K, Linde M, Debener T. The use of two complementary DNA assays, AFLP and MLSA, for epidemic and phylogenetic studies of pectolytic enterobacterial strains with focus on the heterogeneous species *Pectobacterium carotovorum*. *Plant Pathology*, 2012, 61 (3) : 498-508.
- [19] Onkendi EM, Moleleki LN. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovora* and *brasiliense* from diseased potatoes in Kenya. *European Journal of Plant Pathology*, 2014, 139 (3) : 557-566.

# Identification of soft rot pathogens on Chinese cabbage [*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *communis* Tsen et Lee] in Beijing

Nana Hu<sup>1</sup>, Chao Li<sup>2</sup>, Qian Wang<sup>1</sup>, Jingpeng Shao<sup>1</sup>, Yanquan Liu<sup>3</sup>, Liang Zhao<sup>1</sup>, Rongcai Ma<sup>1</sup>, Hua Xie<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

<sup>2</sup> Agricultural Technology Demonstration Station of Daxing, Beijing 102615, China

<sup>3</sup> Plant Service Center of Daxing, Beijing 102600, China

**Abstract:** [Objective] This study aimed to identify soft rot pathogens of Chinese cabbage [*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *communis* Tsen et Lee] in Beijing. [Methods] The 40 strains isolated from Tongzhou and Daxing districts in Beijing were characterized by morphological, biological, biochemical and physiological methods, 16S rRNA sequence as well as 16S-23S rRNA intergenic spacer (IGS) region analysis. [Results] The strains belonged to two different *Pectobacterium carotovorum* subspecies: 13 strains of them belonged to *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) and the other 27 strains belonged to *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (*Pcb*). The results of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) pathogenicity test showed that the strains in the same subspecies, origins and 16S rRNA gene sequences had significant differences in pathogenicity. [Conclusion] *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* were the soft rot pathogens on Chinese cabbage [*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *communis* Tsen et Lee] in Beijing. It was the first report that *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (*Pcb*) caused soft rot disease on cabbage in China.

**Keywords:** *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *communis* Tsen et Lee, soft rot disease, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (*Pcb*), pathogenicity

(本文责编: 李磊, 王晋芳)

Supported by the earmarked fund for Beijing Leafy Vegetables Innovation Team of Modern Agro-industry Technology Research System

\* Corresponding author. Tel: +86-40-51503832; Fax: +86-40-51503980; E-mail: xiehua@baafs.net.cn

Received: 19 January 2015/Revised: 18 March 2015