



任冬冬, 唐纪勇, 崔永一, 辛静静. 一种导致浙江地区蝴蝶兰软腐病发生的病原菌分离鉴定及品种抗性评价[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(8): 109-119.
REN Dongdong, TANG Jiyong, CUI Yongyi, XIN Jingjing. Isolation and identification of a pathogenic bacterium causing soft rot of *Phalaenopsis* in Zhejiang Province and variety resistance evaluation[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(8): 109-119.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.08.09

一种导致浙江地区蝴蝶兰软腐病发生的病原菌分离鉴定及 品种抗性评价

任冬冬 唐纪勇 崔永一 辛静静*

(浙江农林大学 园艺科学学院, 杭州 311300)

摘要 为明确浙江地区蝴蝶兰软腐病的病原种类以及不同蝴蝶兰品种对软腐病的抗病性差异, 采用形态学、生理生化特性研究和系统发育学对蝴蝶兰软腐病进行病菌分离鉴定, 应用离体叶片接种法评估不同蝴蝶兰品种抗病性。结果表明: 1) 蝴蝶兰软腐病病原菌为革兰氏阴性菌, 在营养琼脂培养基(不含葡萄糖)上菌落呈乳白色圆形或近圆形, 在营养琼脂甘油锰培养基上菌落呈浅紫色, 菌体呈杆状。2) 基于16S rRNA、*dnaX*、*gapA*和*recA*基因构建多基因联合系统发育树, 结果表明菌株B与*Dickeya fangzhongdai* B16为同一分支。3) 对40个蝴蝶兰品种进行离体叶片抗软腐病评价, 鉴定出1个高抗品种(‘ES L20’)、1个抗病品种、14个中抗品种、18个感病品种和6个高感品种。本研究鉴定出一种导致浙江地区蝴蝶兰软腐病的病原菌, 提供了部分蝴蝶兰品种的抗软腐病信息, 为深入研究该病害发生规律及防治, 培育抗病品种提供理论依据。

关键词 蝴蝶兰; 软腐病; 病原鉴定; *Dickeya fangzhongdai*; 抗性评价

中图分类号 S436.8

文章编号 1007-4333(2024)08-0109-11

文献标志码 A

Isolation and identification of a pathogenic bacterium causing soft rot of *Phalaenopsis* in Zhejiang Province and variety resistance evaluation

REN Dongdong, TANG Jiyong, CUI Yongyi, XIN Jingjing*

(College of Horticultural Science, Zhejiang Agricultural and Forestry University, Hangzhou 311300, China)

Abstract In order to clarify the pathogen species of soft rot of *Phalaenopsis* in Zhejiang Province and the difference in disease resistance of different *Phalaenopsis* varieties, the pathogen of *Phalaenopsis* soft rot was isolated and identified by the morphology, physiological and biochemical characteristics of bacteria and phylogenetic analysis. The resistance of different *Phalaenopsis* varieties to soft rot was evaluated by *in vitro* leaf inoculation method. The results showed that: 1) The pathogenic of *Phalaenopsis* soft rot were Gram-negative bacteria. The colonies were milky white round or nearly round on nutrient agar (NA) medium (without glucose), and the colonies were light purple on nutrient glycerol manganese (NGM) medium. The single bacterium was observed to be rod-shaped. 2) Based on 16S rRNA, *dnaX*, *gapA* and *recA* genes, a multi-gene phylogenetic tree was constructed, and the analysis showed that strain B belongs to the same branch as *Dickeya fangzhongdai* B16. 3) The resistance of 40 *Phalaenopsis* varieties to soft rot *in vitro* was

收稿日期: 2023-09-20

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(32201610); 浙江省农业新品种重大专项花卉育种专项(2021C02071-5); 浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划项目(2023C02028)

第一作者: 任冬冬(ORCID: 0009-0007-5727-9080), 硕士研究生, E-mail: 202114011002@stu.zafu.edu.cn

通讯作者: 辛静静(ORCID: 0009-0005-7162-2266), 讲师, 主要从事观赏植物抗逆性研究, E-mail: xinjj@zafu.edu.cn

evaluated. It was discovered that there are 1 high resistant variety ‘ES L20’, 1 resistant variety, 14 moderately resistant varieties, 18 susceptible varieties and 6 highly susceptible varieties were identified. In this study, the pathogen causing soft rot of *Phalaenopsis* in Zhejiang Province was identified, and the resistance information of some *Phalaenopsis* varieties was provided. This study laid a foundation for further research on the characteristics of disease occurrence and prevention methods and breeding disease-resistant varieties.

Keywords *Phalaenopsis*; soft rot; pathogen identification; *Dickeya fangzhongdai*; resistance evaluation

蝴蝶兰为兰科、蝴蝶兰属多年生草本植物,原产于中国台湾、泰国和菲律宾等地区,花序形态优美、颜色艳丽,具有极高的观赏价值,长期居于欧洲、日本盆花销售量的榜首^[1],是目前国际市场上最受欢迎的热带兰之一,被誉为“洋兰皇后”。随着蝴蝶兰生产规模快速扩大,病害问题日益凸显,其中,蝴蝶兰软腐病被称为危害蝴蝶兰生产的“头号杀手”,是目前产业化栽培中最为严重的病害之一。该病在一年四季均可发生,尤其以夏秋两季最为严重,并且传染性极强,在高温高湿条件下蔓延极快,数天内即可导致整株植株腐烂死亡,给蝴蝶兰生产带来巨大经济损失^[2]。喷施农药是目前生产上预防蝴蝶兰软腐病的主要措施,但病菌一旦侵入后,一般农药无法抑制病斑的扩展,而且喷施农药会增加生产成本,导致病原抗药性及环境污染等问题。因此,开展蝴蝶兰软腐病抗性研究,培育抗性品种是防控该病害最经济、有效的策略。

虽然研究发现泛菌属(*Pantoea*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、噬酸菌属(*Acidovorax*)和伯克氏菌属(*Burkholderia*)能够导致一些观赏植物软腐病^[3],如褚晓玲等^[4]对武汉地区蝴蝶兰软腐病病原菌进行分离,结合生理生化与分子生物学鉴定为 *Pseudomonas grimontii*;肖爱萍等^[5]对广东省蝴蝶兰软腐病病原菌进行鉴定,结果为 *Burkholderia cepacia*。但目前普遍认为引起园艺作物软腐病的致病菌主要为果胶杆菌属(*Pectobacterium*)和迪基氏菌属(*Dickeya*),该两属目前均被列为植物十大病原菌属之一^[6]。例如普遍引起白菜和黄瓜等蔬菜软腐病^[7]的 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; Alić等^[8]对斯洛文尼亚蝴蝶兰软腐病病原进行全基因组测序,结果表明致病菌为 *Dickeya fangzhongdai*,这是该菌在全球范围内引起蝴蝶兰软腐病的首次报道;Fu等^[9]和 Sudarsono等^[10]认为引起台湾地区和印度尼西亚蝴蝶兰细菌性软腐病的病原菌为 *Erwinia chrysanthemi*;2010年吴志毅等^[11]对杭州地区蝴蝶兰软腐病菌进行了分离鉴定,结果

同为菊欧文氏菌,与国外报道一致。但由于该菌分类产生较大变化,常造成一些文献的引用混乱。*P. grimontii*、*B. cepacia*、*E. chrysanthemi*、*D. fangzhongdai*和 *D. dadantii* subsp. *dieffenbachiae*^[12]均有记载能导致蝴蝶兰软腐病的发生,且由于迪基氏菌属、果胶杆菌属及欧文氏菌属分类及命名变化较为频繁,及时准确识别是哪一种病菌引起目前浙江地区蝴蝶兰软腐病的发生非常必要。同时,导致软腐病的病原在不同地区也有所不同,因此重新对浙江地区蝴蝶兰软腐病病原菌进行鉴定有着重要意义,可为各地区蝴蝶兰软腐病的防治提供科学依据。

抗病性鉴定是评价植物品种、品系或种质对特定病害的抵抗或感染程度,是抗病育种不可或缺的基础研究,从抗源筛选、后代选择,到品种推广的整个过程都离不开抗病性鉴定^[13]。蝴蝶兰作为浙江省主要盆栽花卉,在销售旺季经常出现供不应求的情况,而软腐病是蝴蝶兰产业发展面临的阻力之一。由于抗软腐病品种资源非常有限,抗病育种的进程相对缓慢。因此,本研究对浙江地区蝴蝶兰软腐病进行分离、鉴定,并对40个蝴蝶兰品种进行抗软腐病评价,以期对病害防控、抗病品种的选育及利用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取位于杭州市西湖区的百盛精准农业有限公司种苗基地与位于湖州市德清县的德清天地农林科技有限公司种苗基地发现的蝴蝶兰软腐病典型病株共5株,致病性试验所用蝴蝶兰品种为‘玲珑’‘白天鹅’‘勃艮第’‘第一名’‘小女孩’‘小可爱’,40个供试蝴蝶兰品种种植在浙江农林大学平山试验基地。所有测试植株苗龄为12个月,均未抽梗。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离、纯化

剪取病叶,放入无菌组培瓶中,在瓶口套上纱

布,用清水连续冲洗 20 min;将叶片病健交界处切成 5 mm×5 mm 的组织块并在 75% 酒精溶液中连续震荡 30 s,迅速用无菌水冲洗干净;将组织块放入 3% 次氯酸钠溶液中消毒 2 min,无菌水冲洗 3 次;将组织块表皮撕开,放置营养琼脂(NA)平板上 28 ℃ 暗培养 2 d;用平板划线法将组织块周围生长的细菌纯化 3 次后,用营养肉汤(NB)培养液进行培养,配制成甘油终浓度为 25% 的甘油菌液混合物,−80 ℃ 保存菌株。

1.2.2 柯赫氏法则验证及致病性测定

采用活体针刺接种法进行柯赫氏法则(Koch’s postulates)验证,若发病则分离病菌,配制浓度为 1×10⁸ CFU/mL 的菌悬液。将菌悬液回接至上述 6 个品种的由上至下第二真叶中脉两侧,用无菌接种针刺破叶片表皮,吸取 0.5 μL 菌液接种至叶肉组织伤口上。每个叶片共 4 个接种点,中脉左侧接种菌悬液,右侧接种 NB 培养液,及时观察发病情况和症状,并在接种 24 h 后记录病斑大小。

1.2.3 致病菌形态观察及生理生化鉴定

观察纯化后的菌落颜色、形态等特征,使用营养琼脂甘油锰(NGM)培养基对致病菌进行培养,观察菌体表面有无浅紫色产生^[14];采用湖南比克曼生物科技有限公司的革兰氏染色试剂盒进行染色。

使用杭州微生物试剂有限公司的细菌生化鉴定管对致病菌进行半固体琼脂(运动性)试验、乙酰甲基甲醇(V-P)试验、甲基红(MR)试验、尿素分解、硫化氢产生及各类糖(醇)利用等细菌生理生化特

性研究。

1.2.4 致病菌分子鉴定

收集菌体,采用 CTAB 法^[15]提取致病菌总基因组 DNA。所需引物见表 1,引物均由北京擎科生物科技股份有限公司合成,利用 27F/1492R 通用引物对致病菌基因组的 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:2×EasyTaq PCR SuperMix 25 μL、27F 2 μL、1492R 2 μL、DNA 2 μL、ddH₂O 19 μL,共计 50 μL。PCR 扩增程序:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,57 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 100 s,35 个循环;72 ℃ 终延伸 8 min。通过查阅文献,选取 *dnaX*、*recA* 和 *gapA* 基因作进一步鉴定,PCR 反应体系:2×EasyTaq PCR SuperMix 37.5 μL、正向引物 3 μL、反向引物 3 μL、DNA 3 μL、ddH₂O 28.5 μL,共计 75 μL。PCR 扩增程序:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 70 s,30 个循环;72 ℃ 终延伸 5 min。

PCR 产物在 1×TAE 中进行 1% 琼脂糖凝胶电泳验证。将含有目的条带的凝胶回收,连接 pMD18-T 载体并转化大肠杆菌感受态细胞进行抗性筛选,挑取阳性菌落经菌检后送至北京擎科生物科技股份有限公司杭州分公司测序。对测序结果用 BLAST 程序与 GenBank 数据库中已知序列进行比对和同源性分析,将序列按照 16S rRNA-*dnaX*-*gapA*-*recA* 顺序拼接,采用贝叶斯法(MrBayes)构建多基因联合系统发育树,设置 generations 为 5 000 000。

表 1 分子鉴定所需引物序列
Table 1 Primers sequence for molecular identification

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	产物长度/bp Product length	参考文献 Reference
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1 504	[10]
1492R	CGGTTACCTTGTTACGACTT		
dnaXf	TATCAGGTYCTTGCCCGTAAGTGG	536	[16]
dnaXr	TCGACATCCARCGCYTTGAGATG		
recAf	GGTAAAGGGTCTATCATGCG	737	[17]
recAr	CCTTCACCATACATAATTTGGA		
gapAf	ATCAAAGTAGGTATCAACGG	932	[18]
gapAr	TCRTACCARGAAACCAGTT		

1.2.5 抗病性评价

通过预试验发现接种致病菌 6 h 后,接种点周围出现小规模水渍状病斑。在接种 24 h 后部分品种病斑即将扩散至叶片边缘,此时不同品种的病斑大小能够体现出抗病差异,因此选用致病菌侵染 24 h 作为抗病性评价病斑面积计算时间。

用 NB 培养液配制 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液,并用无菌水将拟接种叶片擦拭干净,剪取合适大小;在培养皿中放 2 张无菌滤纸,吸取 2 mL 无菌水将滤纸均匀打湿;将剪取的叶片放入培养皿中,轻轻刺破叶片表皮,吸取 0.5 μ L 菌液打至伤口表面,对照处理接种 NB 培养液;将培养皿密封后放置光照培养箱中培养。设置昼/夜温度 29 $^{\circ}$ C/26 $^{\circ}$ C、相对湿度 85%,先黑暗培养 10 h,再光照培养 14 h,在接种后 0、6、12 和 24 h 对病斑进行拍照记录。每株叶片接种点位于由上至下第二真叶中脉两侧,取发病后 2 个病斑的平均面积作为该株病斑面积分级标准取值。每个品种接种 10 株,3 次生物学重复。

由于采用蝴蝶兰离体叶片进行针刺接种,且不同品种叶片大小差异较大,因此不适宜使用病斑面积与叶片总面积比值法作为分级标准。参考马燕勤等^[19]的病情分级标准,结合蝴蝶兰软腐病病斑实际情况稍加改动,建立了病斑面积分级法标准。分级标准如下:0 级:无水渍状病斑;1 级: $0\text{ cm}^2<\text{病斑总面积}\leq 1.5\text{ cm}^2$;2 级: $1.5\text{ cm}^2<\text{病斑总面积}\leq 3\text{ cm}^2$;3 级: $3\text{ cm}^2<\text{病斑总面积}\leq 4.5\text{ cm}^2$;4 级: $4.5\text{ cm}^2<\text{病斑总面积}\leq 6\text{ cm}^2$;5 级:病斑总面积 $>6\text{ cm}^2$ 。

接种点发病率=(发病接种点/总接种点) $\times$ 100%
(1)

病情指数(Disease index, DI)= $\sum$ (各级发病株

数 $\times$ 该级代表值)/(总株数 $\times$ 最高病级代表值) $\times$ 100^[20]
(2)

蝴蝶兰品种抗性划分^[19,21]见表 2。

表 2 病情指数分类标准	
Table 2 Classification standard of disease index	
病情指数	抗病性
Disease index	Disease resistance
0.00	免疫(I)
0.01~20.00	高抗(HR)
20.01~40.00	抗病(R)
40.01~60.00	中抗(MR)
60.01~80.00	感病(S)
80.01~100.00	高感(HS)

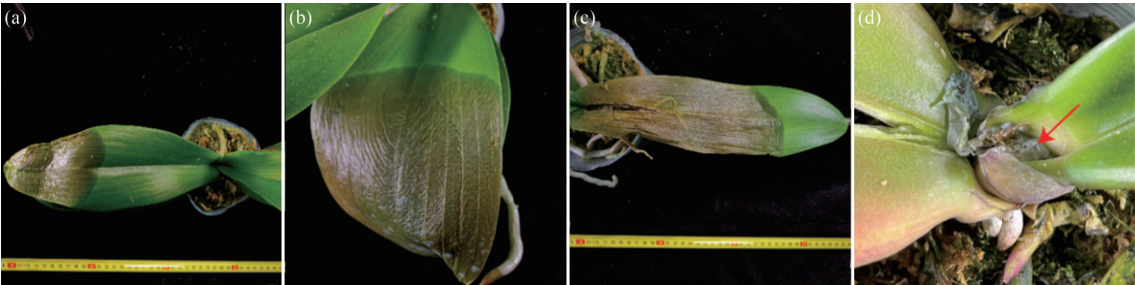
1.3 数据分析

使用 ImageJ 1.53k 软件计算病斑面积,利用 PhyloSuite 软件构建多基因联合系统发育树,采用 Microsoft Excel 2016 软件统计和分析数据,应用 SPSS 26.0 软件对试验数据进行单因素方差分析,使用 Duncan's 新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 病害症状

蝴蝶兰软腐病可发生在植株叶片和根茎部位。初期为水渍状斑点,在光源照射下表现透明状,随后在高温高湿环境下迅速扩大,整个叶片内部形成浸渍,但仍被叶片蜡质层与角质层所包裹(图 1(a))。当病斑扩散到一定程度时,原先感染区域变为褐色坏死组织(图 1(b)),在溃烂后发出恶臭(图 1(c))。同时,病斑会迅速蔓延到其他部位(图 1(d)),导致整株蝴



(a)和(b)软腐病发病中期;(c)软腐病导致叶片溃烂;(d)软腐病发病后期,叶片脱落,茎逐渐腐烂。
(a) and (b): The middle stage of soft rot development;(c) The soft rot disease caused leaf decay;(d) The leaf fall off and the stem gradually decay in the late stages of soft rot.

图 1 蝴蝶兰软腐病病株
Fig. 1 *Phalaenopsis* soft rot disease plant

蝶兰腐烂并死亡。

2.2 柯赫氏法则验证与致病力测定

经柯赫氏法则验证,分离并纯化后的菌株 B 可导致蝴蝶兰软腐病的发生,并与采集的软腐病病株症状相同,形成水渍状病斑并逐渐褐化。‘玲

珑’‘白天鹅’‘勃艮第’‘第一名’‘小女孩’‘小可爱’品种接种菌株 B 24 h 后的病斑表型如图 2 所示,中脉左侧为接种后的软腐病斑,右侧对照均未发病,由此判定菌株 B 为浙江地区蝴蝶兰软腐病的致病菌。



图 2 软腐病菌的致病力测定

Fig. 2 Determination of the pathogenicity of soft rot bacteria

2.3 形态学观察

将致病菌接种至 NA 培养基,28 ℃ 黑暗培养 36 h,菌株 B 在培养基形成乳白色、表面光滑、圆形或近圆形的单菌落(图 3(b)),伴有刺激性气味;革兰氏染色结果呈示菌株 B 为阴性菌。在 NGM 培养基上,菌体表面呈浅紫色(图 3(c)),根据 Lee 等^[14]初步判定菌株 B 为迪基氏菌属;在 100 倍油镜下菌株 B 单菌呈杆状(图 3(d))。

2.4 生理生化鉴定

生理生化试验结果表明(表 3),菌株 B 具备在 39 ℃ 生长的能力,具有运动性,能够分解蛋白胨生成吡啶;不能分解半胱氨酸产生硫化氢,不能产生苯丙氨酸脱氨酶,不能氧化葡萄糖酸盐,不能分解尿素,在 MR 试验和 V-P 试验中显示阴性。菌株 B 可以利用枸橼酸盐、棉子糖、木糖、蔗糖和甘露醇,不能利用赖氨酸、鸟氨酸、山梨醇和侧金盏花醇。

2.5 分子生物学鉴定

以菌株 B 基因组 DNA 为模板,使用引物对 27F/1492R 扩增 16S rRNA 基因序列,获得 1 504 bp 基因片段。将测序所获序列上传至 GenBank,登录号为 OQ804352。通过与 Genbank 的数据库进行

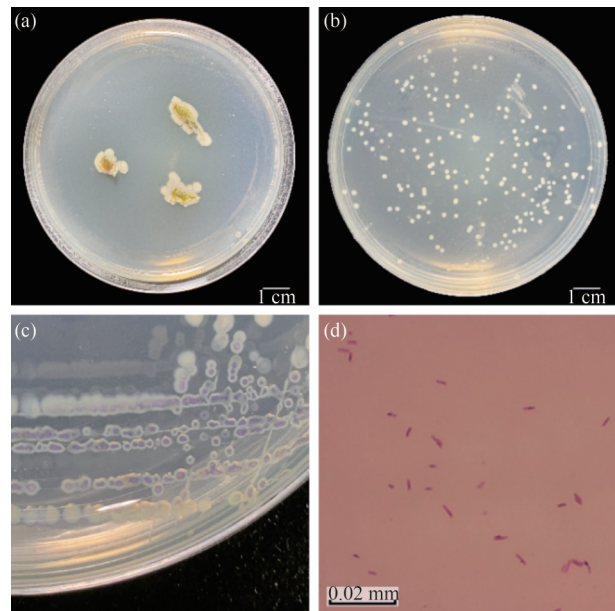


图 3 菌株 B 致病菌形态学观察

Fig. 3 Morphological observation of the pathogenic bacteria strain B

表3 菌株B生理生化特征
Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain B

生理生化特征 Physiological and biochemical characteristics	菌株B Strain B	生理生化特征 Physiological and biochemical characteristics	菌株B Strain B
39℃生长 Growth at 39℃	+	靛基质产生 Indole production	+
运动性试验 Kinetic test	+	赖氨酸脱羧 Decarboxylated lysine	—
苯丙氨酸脱氨 Phenylalanine deamination	—	鸟氨酸脱羧 Decarboxylated ornithine	—
葡萄糖酸盐氧化 Gluconate oxidation	—	棉子糖发酵 Fermented raffinose	+
硫化氢产生 H ₂ S production	—	木糖发酵 Fermented xylose	+
甲基红试验 Methylred (MR) test	—	蔗糖发酵 Fermented sucrose	+
乙酰甲基甲醇试验 Voges-Proskauer (V-P) test	—	山梨醇发酵 Fermented sorbitol	—
枸橼酸盐利用 Citrate utilization	+	甘露醇发酵 Fermented mannitol	+
尿素分解 Urea decomposition	—	侧金盏花醇发酵 Fermented adonitol	—

注：“+”表示阳性；“—”表示阴性。
Notes: + indicate positive; — indicate negative.

BLAST 比对,结果显示测序序列与 GenBank 中 *D. fangzhongdai* 和 *D. chrysanthemi* 的相似性均高达 99% 以上,结合形态学观察确定致病菌属于迪基氏菌属。由于 16S rRNA 基因在 *Dickeya* 属内近缘种间的差异性较小,因此对菌株 B 作深层次的 *dnaX*、*recA* 和 *gapA* 持家基因分子鉴定。使用引物 *dnaX*f/*dnaX*r、*recA*f/*recA*r 和 *gapA*f/*gapA*r 扩增 3 个基因序列,分别获得 536、737 和 932 bp 基因片段。不同基因序列通过 BLAST 比对,结果表明菌株 B 与标准菌株 *D. fangzhongdai* DSM 101947 相似性最高,均达到 99.5% 以上。将序列按 16S rRNA、*dnaX*、*gapA* 和 *recA* 顺序拼接并构建多基因联合系统发育树,结果显示菌株 B 与菌株 *D. fangzhongdai* B16 属于同一分支(图 4),由此确定引起浙江省蝴蝶兰软腐病的致病菌为 *D. fangzhongdai*。

2.6 抗病性评价

对 40 个蝴蝶兰品种进行离体叶片抗软腐病评价,结果表明不同品种对软腐病菌抗性存在较大差异,部分品种接种软腐病菌后不同时间病斑表型图如图 5 所示,对照处理均未发病。40 个品种共 800 个接种点,发病接种点为 756 个,占接种点总数的 94.5%;对照接种点均未发病。共得到 5 个抗性分类级别,分别为:高抗品种 1 个,占比 2.5%;抗病品种 1 个,占比 2.5%;中抗品种 14 个,占比 35%;感病品

种 18 个,占比 45%;高感品种 6 个,占比 15%。通过观察发现不同抗病性级别的品种在接种后 12~24 h 病斑面积增长幅度最大。高抗品种‘ES L20’在测试的 20 个接种点中有 16 个接种点病斑面积为 0,其余病斑面积则极小,接种点发病率为 20%,病情指数为 8.33,平均病斑面积仅为 0.47 cm²。抗病品种‘桤柑’接种点发病率为 80%,病情指数 40.00,平均病斑面积为 2.33 cm²。6 个高感品种分别为‘紫水晶’‘巨无霸’‘红梅’‘缇娜 3#’‘P. Sogo Chabstic’‘勃艮第’,这 6 个高感品种发病率均高于 95%,形成的病斑以接种点为中心,扩散至叶片边缘。病情指数最大的品种为‘紫水晶’,达到 93.33,该品种发病率 100%,平均病斑面积为 6.88 cm²(表 4)。

3 讨论

近年来,16S rRNA 基因序列分析已经成为细菌分类鉴定中的常用方法^[22],不过由于 16S rRNA 基因存在多拷贝及高度保守的特点,单独利用其对某些细菌进行分类研究存在局限性。相比之下,*dnaX*^[16]、*recA*^[17]和 *gapA*^[18] 基因作为单拷贝持家基因,普遍存在于各种细菌中并且不发生水平转移,因此在区分和鉴定细菌近缘种时,将其与 16S rRNA 基因序列进行拼接并构建多基因联合系统发育树具有更高的分辨率。

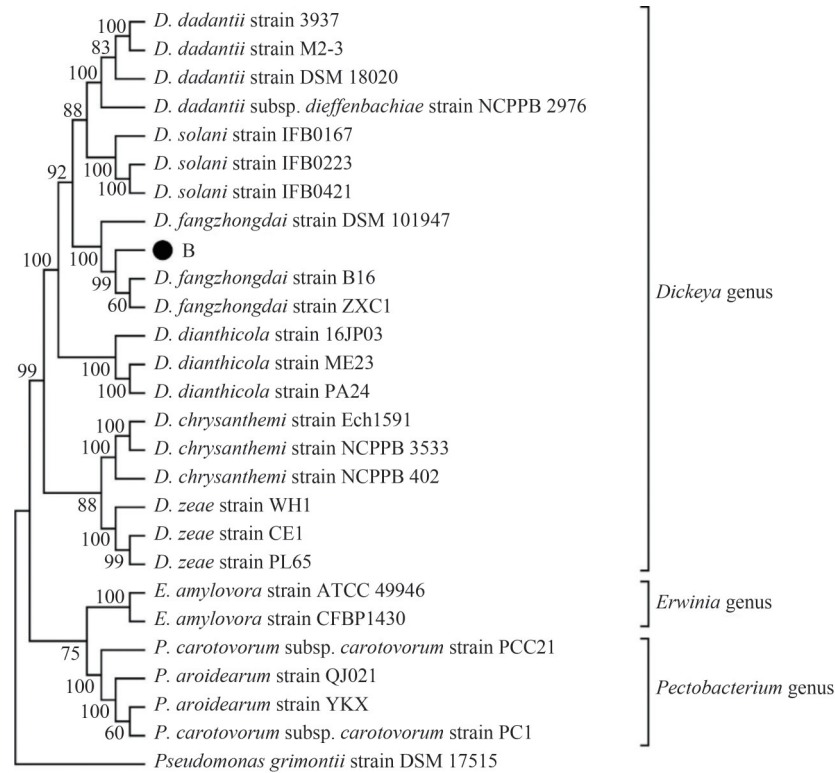


图 4 基于 16S rRNA、*dnaX*、*gapA* 和 *recA* 基因序列构建的多基因联合系统发育树

Fig. 4 Multigene joint phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA, *dnaX*, *gapA* and *recA* gene sequences

表 4 不同蝴蝶兰品种抗软腐病评价结果

Table 4 Evaluation results of soft rot resistance of different *phalaenopsis* varieties

品种编号 Variety No.	品种名称 Variety	接种点发病率/% Incidence of inoculation point	病斑面积/cm ² Lesion area	病情指数 Disease index	抗病类型 Resistant type
P01	大辣椒 <i>Phal.</i> ‘Big chili’	100	4.26±0.50	68.33±3.60 cdefghi	S
P02	三色鸟 Sanseniaio	100	4.66±0.35	71.67±11.79 cdefgh	S
P03	仙蒂 Xiandi	95	4.60±0.78	69.44±6.71 cdefghi	S
P04	小女孩 Xiaonvhai	100	4.72±0.32	73.89±0.79 bcdefg	S
P05	紫水晶 Zishuijing	100	6.88±0.40	93.33±9.43 a	HS
P06	玲珑 Linglong	95	5.63±0.77	78.89±9.56 abcde	S
P07	绿如意 lvruyi	100	5.25±0.54	77.22±5.50 bcdef	S
P08	巨无霸 Juwuba	100	5.64±0.44	82.22±13.70 abc	HS
P09	金公主 Jingongzhu	100	2.48±0.33	43.89±2.83 mn	MR
P10	小可爱 Xiaokeai	95	3.62±0.53	56.11±2.83 hijklm	MR
P11	黄天使 Huangtianshi	95	4.24±0.66	65.55±8.75 defghijk	S
P12	皇后 Huanghou	80	3.52±0.43	57.78±3.14 hijklm	MR
P13	红梅 Hongmei	90	5.22±0.30	80.56±4.78 abcde	HS
P14	吉祥 Jixiang	100	4.09±0.49	65.00±7.58 efghijk	S
P15	缇娜 3# Tina 3#	100	5.16±0.24	81.11±9.56 abcd	HS

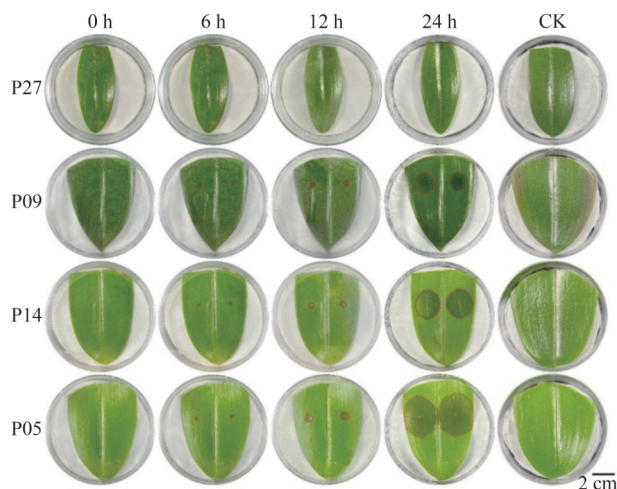
表4(续)

品种编号 Variety No.	品种名称 Variety	接种点发病率/% Incidence of inoculation point	病斑面积/cm ² Lesion area	病情指数 Disease index	抗病类型 Resistant type
P16	女神 Nvshen	100	3.72±0.48	57.78±3.14 hijklm	MR
P17	第一名 Diyiming	100	2.78±0.41	46.11±0.79 lmn	MR
P18	红天使 Hongtianshi	100	3.98±0.51	61.67±2.36 fghijkl	S
P19	孔雀开屏 Kongquekaiping	85	2.95±0.44	51.11±6.28 klmn	MR
P20	<i>P.</i> (Mituo Sun×Palace Reef) ‘red’	100	3.24±0.61	51.67±8.50 jklmn	MR
P21	<i>P.</i> Chienlung Sweet Heart	95	4.38±0.43	67.22±6.14 cdefghij	S
P22	<i>P.</i> Tzu Chiang Chrisna	100	2.77±0.52	47.22±6.14 lmn	MR
P23	<i>P.</i> Lyndon Mix Zebra ‘809’	85	3.77±0.67	56.10±2.84 hijklm	MR
P24	<i>P.</i> Sogo Chabstic	100	5.88±0.59	88.33±3.60 ab	HS
P25	<i>P.</i> CS559P. mannii	100	4.23±0.63	61.67±5.93 fghijkl	S
P26	<i>P.</i> KS Happy Eagle× <i>P.</i> Samera “BK”(<i>P.</i> belline× <i>P.</i> hieroglyphica “8cm”)× <i>P.</i> Yu Pin Polar Bear	100	5.13±0.31	75.00±7.58 bcdef	S
P27	<i>P.</i> (Tzu Chiang Balm×Taida Pearl) ES L20	20	0.47±0.16	8.33±3.60 o	HR
P28	甜心公主 Tianxingongzhu	95	2.74±0.18	45.00±7.07 mn	MR
P29	赛冰冰 Saibingbing	100	3.31±0.63	53.89±0.79 ijklmn	MR
P30	白天鹅 Baitiane	100	2.69±0.47	45.56±4.16 mn	MR
P31	台大微笑 Taidaweixiao	100	4.99±0.53	76.67±4.71b bcdef	S
P32	椪柑 Ponkan	80	2.33±0.40	40.00±5.45 n	R
P33	罗曼史情人 Luomanshiqingren	100	2.82±0.49	48.33±3.60 lmn	MR
P34	满天红 <i>Dtps.</i> Queen Beer	100	4.44±0.48	70.56±6.71 cdefgh	S
P35	勃艮第 Burgundy	100	5.50±0.39	81.67±2.36 abc	HS
P36	紫蝶 Zidie	95	3.64±0.11	58.32±11.12 ghijklm	MR
P37	小兰屿蝴蝶兰 <i>P. equestris</i> var. <i>alba</i> × <i>sib</i>	100	4.72±0.66	68.89±8.31 cdefghi	S
P38	纳博讷 Narbonne	100	4.40±0.29	70.00±8.16 cdefgh	S
P39	曼塔佩尼达 MANTA PENIDA	95	4.54±0.54	69.45±3.93 cdefghi	S
P40	拉斯维加斯 Las Vegas	80	4.84±0.40	77.22±9.06 bcdef	S

注:同列数据间不同小写字母表示品种间差异显著($P<0.05$)。
Notes:Different lowercase letters between the same column data indicated significant differences between varieties($P<0.05$).

软腐病是目前兰科花卉产业最具破坏性的病害之一,其病原主要为迪基氏菌属及果胶杆菌属。本研究从5株浙江不同地区受软腐病菌侵染的蝴蝶

兰叶片中分离出一种病原菌,依据柯赫氏法则验证与致病性测定,分别接种分离的病原菌于6个品种的健康蝴蝶兰叶片,对应叶片均发病,且再次分离



4个不同抗性品种接种菌株B后0、6、12、24 h及接种对照24 h的病斑表型。P27:高抗品种‘P. (Tzu Chiang Balm×Taida Pearl) ES L20’;P09:中抗品种‘金公主’;P14:感病品种‘吉祥’;P05:高感品种‘紫水晶’。

Lesion phenotypes of 4 different resistant varieties at 0, 6, 12 and 24 h after inoculation with the strain B and inoculation control at 24 h. P27: High resistant variety ‘P. (Tzu Chiang Balm×Taida Pearl) ES L20’; P09: Moderately resistant variety ‘Jingongzhu’; P14: Susceptible variety ‘Jixiang’; P05: High susceptible variety ‘Zishuijing’.

图5 4个不同抗性品种接种菌株B后不同时间的病斑表型
Fig. 5 Lesion phenotypes of 4 different resistant varieties at different time periods after inoculation with strain B

纯化出相应的病原菌,经形态学观察、生理生化特性研究和分子生物学鉴定,结果表明病原菌为 *D. fangzhongdai*。该菌隶属的迪基氏属细菌能对多种作物引起腐烂性病害,如香蕉、玉米、马铃薯、番茄和梨树等^[23],是目前导致植物病害最严重的10种植物病原菌属之一^[6]。*D. fangzhongdai*是2016年从梨树锈水病中分离并结合多基因联合发育分析、全基因组平均核苷酸同源性分析等鉴定的新种^[24],是迪基氏属唯一能引起乔木植物病害的病原,在基因组上与 *D. dadantii*、*D. dianthicola* 和 *D. solani* 分支接近。*D. fangzhongdai*的寄主广泛,具有较强致病能力,能够引起多种园艺作物软腐病害,如半夏^[25]、大葱^[26]、魔芋^[27]和香芋^[28]等,其侵染部位普遍以叶片为主,在高温高湿条件下迅速扩散,从而导致全株腐烂,造成巨大经济损失。同时,该菌在全球范围内已普遍引起蝴蝶兰、文心兰和卡特兰等兰科花卉软腐病。Zhang等^[29]在2018年对广东省蝴蝶兰软腐病菌进行全基因组测序,结果证实致病菌为 *D. fangzhongdai*,这是该菌在国内引起蝴蝶兰

软腐病的首次报道。有研究发现^[30], *D. fangzhongdai*部分菌株可在水中长时间存活并已被成功分离,因此在蝴蝶兰栽培管理过程中应注重灌溉水质和环境,在发现有病株存在时需及时隔离处理,避免浇灌时水源受病菌交叉污染。由于不同地区蝴蝶兰软腐病病原有所不同,本研究鉴定出一种导致浙江地区蝴蝶兰软腐病的病原菌,可为当地今后的软腐病病害防控提供重要的理论支撑。

人工接种进行抗病性评价是筛选抗软腐病品种的一种重要方式。离体接种鉴定作为人工接种方法的一种,具有准确、快速、筛选量大和受外界环境条件影响较小等优点,已广泛应用于大白菜、甜瓜和西瓜等园艺作物的病害抗性鉴定^[31]。本研究前期预试验发现直接在蝴蝶兰叶片表面涂抹菌液或利用无菌棉吸取菌液敷在叶片表面难以发病,说明软腐病菌主要依靠伤口进行侵染,这与沈会芳等^[32]的研究结果相似,故本研究采用针刺法进行接种。目前国内对蝴蝶兰软腐病的研究主要集中于致病菌的分离和鉴定,而在不同蝴蝶兰品种抗软腐病评价方面的研究相对较少。本研究通过离体叶片结合针刺接种的方法,对40个蝴蝶兰品种进行了抗病性评价,结果显示大部分品种为感病或中抗型;‘ES L20’对软腐病菌表现出较高的抗性,超过市场上常见的品种,有望在育种工作中作为蝴蝶兰抗软腐病的亲本,进行定向育种。目前‘ES L20’品种抗软腐病菌侵染的主要机制尚未清楚,因此,未来有必要进一步探究其抗软腐病的分子机理,挖掘相关抗性基因,从而为科学防治软腐病和蝴蝶兰抗软腐病育种研究奠定基础。

4 结 论

本研究采用组织分离法对浙江地区蝴蝶兰软腐病病株进行致病菌分离与纯化,并通过柯赫氏法则验证,结合形态学观察、细菌生理生化特性研究与多基因联合系统发育分析,发现一种引起浙江地区蝴蝶兰细菌性软腐病的病原菌为 *D. fangzhongdai*。利用病原菌株B对40个蝴蝶兰品种进行抗软腐病评价,鉴定出1个高抗品种(‘ES L20’)、1个抗病品种、14个中抗品种、18个感病品种和6个高感品种。

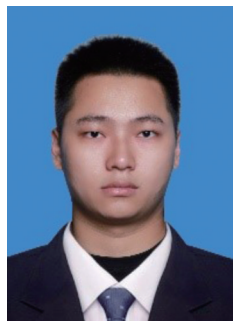
参考文献 References

- [1] 于宏,郭丽娟,杨阳,张晓磊,孙曼,曹广信.郑州市蝴蝶兰产业发展调研

- 报告[J]. 河南林业科技, 2022, 42(3): 28-31
- Yu H, Guo L J, Yang Y, Zhang X L, Sun M, Cao G X. The research report of Zhengzhou *Phalaenopsis* industry development[J]. *Journal of Henan Forestry Science and Technology*, 2022, 42(3): 28-31 (in Chinese)
- [2] 尤毅, 肖文芳, 李佐, 陈和明, 吕复兵. 蝴蝶兰软腐病研究进展[J]. 广东农业科学, 2014, 41(1): 61-66
- You Y, Xiao W F, Li Z, Chen H M, Lv F B. Research progress on *Phalaenopsis* soft-rot disease [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, 41(1): 61-66 (in Chinese)
- [3] Joko T, Subandi A, Kusumandari N, Wibowo A, Priyatmojo A. Activities of plant cell wall-degrading enzymes by bacterial soft rot of orchid [J]. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2014, 47(10): 1239-1250
- [4] 褚晓玲, 杨波. 蝴蝶兰软腐病中一种新致病菌的分离与鉴定[J]. 植物病理学报, 2010, 40(1): 90-94
- Chu X L, Yang B. Isolation and identification of a new pathogen causing soft rot of *Phalaenopsis amabilis* [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2010, 40(1): 90-94 (in Chinese)
- [5] 肖爱萍, 游春平, 向梅梅. 蝴蝶兰细菌性软腐病病原鉴定[J]. 广东农业科学, 2012, 39(15): 74-75
- Xiao A P, You C P, Xiang M M. Identification of the pathogen causing soft rot of *Phalaenopsis amabilis* [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 39(15): 74-75 (in Chinese)
- [6] Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer S V, Machado M A, Toth I, Salmond G, Foster G D. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(6): 614-629
- [7] 张世昌, 张宇璐, 谭晓东, 郭荣君, 李世东, 罗明. 拮抗链霉菌26B的筛选及其在不同含水量土壤中对白菜软腐病的防病效果[J]. 中国生物防治学报, 2023, 39(1): 157-166
- Zhang S C, Zhang Y L, Tan X D, Guo R J, Li S D, Luo M. Screening of antagonistic *Streptomyces* 26B and its efficacy on the control of soft rot disease of Chinese cabbage in soil with different water content [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2023, 39(1): 157-166 (in Chinese)
- [8] Alić Š, Naglič T, Llop P, Toplak N, Koren S, Ravnika M, Dreot T. Draft genome sequences of *Dickeya* sp isolates B16 (NIB Z 2098) and S1 (NIB Z 2099) causing soft rot of *Phalaenopsis* orchids [J]. *Genome Announcements*, 2015, 3(5): e00973-e00915
- [9] Fu S F, Tsai T M, Chen Y R, Liu C P, Haiso L J, Syue L H, Yeh H H, Huang H J. Characterization of the early response of the orchid, *Phalaenopsis amabilis*, to *Erwinia chrysanthemi* infection using expression profiling[J]. *Physiologia Plantarum*, 2012, 145(3): 406-425
- [10] Sudarsono S, Elina J, Giyanto G, Sukma D. Pathogen causing *Phalaenopsis* soft rot disease-16S rDNA and virulence characterisation [J]. *Plant Protection Science*, 2018, 54(1): 1-8
- [11] 吴志毅, 方媛, 陈曦, 张慧丽, 张明哲, 李斌. 浙江省蝴蝶兰细菌性软腐病病原鉴定[J]. 浙江林学院学报, 2010, 27(4): 635-639
- Wu Z Y, Fang Y, Chen X, Zhang H L, Zhang M Z, Li B. Pathogen identification of bacterial soft rot in moth orchid in Zhejiang Province[J]. *Journal of Zhejiang Forestry College*, 2010, 27(4): 635-639 (in Chinese)
- [12] Zhou J N, Lin B R, Shen H F, Pu X M, Chen Z N, Feng J J. First report of a soft rot of *Phalaenopsis aphrodita* caused by *Dickeya dieffenbachiae* in China[J]. *Plant Disease*, 2012, 96(5): 760
- [13] 杨宏. 宁夏银川地区番茄猝倒病病原菌的鉴定、抗病性鉴定方法的研究及种质资源的抗病性评价[D]. 银川: 宁夏大学, 2022
- Yang H. Identification of pathogenic bacteria of tomato damping-off disease in Yinchuan area, Ningxia, research on identification methods of disease resistance and disease resistance evaluation of germplasm resources[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2022 (in Chinese)
- [14] Lee Y A, Yu C P. A differential medium for the isolation and rapid identification of a plant soft rot pathogen, *Erwinia chrysanthemi* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 64(2): 200-206
- [15] 杨琦玥, 黄勇, 陈亚冰, 刘洛川, 李键, 兰道亮. 16S rRNA高通量测序技术筛选牦牛瘤胃细菌基因组DNA提取方法及菌群结构[J]. 中国农业科学, 2017, 50(5): 932-941
- Yang Q Y, Huang Y, Chen Y B, Liu L C, Li J, Lan D L. Screening of optimal DNA extraction methods and the bacterial community composition of yak rumen revealed by high 16S rRNA throughput sequencing[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(5): 932-941 (in Chinese)
- [16] Sławiak M, van Beckhoven J R C M, Speksnijder A G C L, Czajkowski R, Grabe G, van der Wolf J M. 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
- [17] Waleron M, Waleron K, Podhajski A J, Łojkowska E. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment[J]. *Microbiology*, 2002, 148(Pt 2): 583-595
- [18] Cigna J, Dewaegeire P, Beury A, Gobert V, Faure D. A *gapA* PCR-sequencing assay for identifying the *Dickeya* and *Pectobacterium* potato pathogens[J]. *Plant Disease*, 2017, 101(7): 1278-1282
- [19] 马燕勤, 李勤菲, 司军, 宋洪元, 任雪松. 甘蓝抗软腐病离体鉴定方法探究[J]. 植物保护, 2018, 44(6): 136-140
- Ma Y Q, Li Q F, Si J, Song H Y, Ren X S. Assessment of inoculation method for identifying resistance to soft rot in cabbage [J]. *Plant Protection*, 2018, 44(6): 136-140 (in Chinese)
- [20] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1998
- Fang Z D. *Research Methods of Plant Diseases* [M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998 (in Chinese)
- [21] 杨祁云, 林璧润, 沈会芳, 张景欣, 孙大元, 蒲小明. 一种蝴蝶兰软腐病抗性鉴定方法. 中国, CN111593088A[P]. 2020-08-28
- Yang Q Y, Lin B Y, Shen H F, Zhang J X, Sun D Y, Pu X M. A method for resistance identification of *Phalaenopsis* soft rot. China, CN111593088A[P]. 2020-08-28 (in Chinese)
- [22] Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, 32(2): 335-351
- [23] Ma B, Hibbing M E, Kim H S, Reedy R M, Yedidia I, Breuer J, Breuer J, Glasner J D, Perna N T, Kelman A, Charkowski A O. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*[J]. *Phytopathology*, 2007, 97(9): 1150-1163
- [24] Tian Y L, Zhao Y Q, Yuan X L, Yi J P, Fan J Q, Xu Z G, Hu B S, De Boer S H, Li X. *Dickeya fangzhongdai* sp nov, a plant-pathogenic bacterium isolated from pear trees (*Pyrus pyrifolia*) [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(8): 2831-2835
- [25] Wang F F, Tang T, Mao T, Guo J, Guo X L, Duan Y Y, You J M. Occurrence of *Dickeya fangzhongdai* causing soft rot of Banxia (*Pinellia ternata*) in China[J]. *Plant Disease*, 2021, 105(10): 3288
- [26] Tsai W A, Lin P R, Huang C J. First report of *Dickeya fangzhongdai* causing soft rot disease of Welsh onion in Taiwan[J]. *Journal of Plant*

- Pathology*, 2019, 101: 797-798
- [27] 孙苗苗. 魔芋软腐病原鉴定及快速检测技术研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019
- Sun M M. Pathogen identification and rapid detection method development for soft rot of *Amorphophallus konjac* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- [28] 王莹乐, 李泳霖, 梁雪, 黄淑芬, 张炼辉, 廖立胜, 周筱帆. 生物炭环境协同生防菌 *Bacillus amyloliquefaciens* P4 防控香芋软腐病的研究[J]. 湖北农业科学, 2022, 61(21): 79-85
- Wang Y L, Li Y L, Liang X, Huang S F, Zhang L H, Liao L S, Zhou X F. Study on the prevention and control of taro soft rot by biochar environment combined with biocontrol bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* P4 [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2022, 61(21): 79-85 (in Chinese)
- [29] Zhang J X, Hu J, Shen H F, Zhang Y C, Sun D Y, Pu X M, Yang Q Y, Fan Q R, Lin B R. Genomic analysis of the *Phalaenopsis* pathogen *Dickeya* sp PA1, representing the emerging species *Dickeya fangzhongdai* [J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 782
- [30] Alič Š, van Gijsegem F, Pédrón J, Ravnikar M, Dreot T. Diversity within the novel *Dickeya fangzhongdai* sp, isolated from infected orchids, water and pears [J]. *Plant Pathology*, 2018, 67(7): 1612-1620
- [31] 杨璐嘉, 初炳瑶, 邓杰, 何少清, 张怡, 马占鸿. 宁夏葡萄霜霉病菌致病型鉴定及葡萄品种抗性评价[J]. 植物保护学报, 2020, 47(6): 1321-1332
- Yang L J, Chu B Y, Deng J, He S Q, Zhang Y, Ma Z H. Pathotype identification of downy mildew pathogen *Plasmopara viticola* and evaluation of variety resistance in Ningxia [J]. *Journal of Plant Protection*, 2020, 47(6): 1321-1332 (in Chinese)
- [32] 沈会芳, 张景欣, 杨祁云, 蒲小明, 孙大元, 刘平平, 林璧润. 二氧化氯对蝴蝶兰软腐病菌的抑杀作用评价: 基于病害流行因子[J]. 中国农学通报, 2021, 37(31): 118-126
- Shen H F, Zhang J X, Yang Q Y, Pu X M, Sun D Y, Liu P P, Lin B R. Evaluation of inhibitive effect of chlorine dioxide on *Dickeya fangzhongdai*: Based on disease epidemic factors [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2021, 37(31): 118-126 (in Chinese)

责任编辑: 董金波



第一作者简介: 任冬冬, 硕士研究生, 现就读于浙江农林大学园艺学专业。本科毕业于信阳农林学院设施园艺专业。本科期间曾获院优秀毕业生, 硕士期间获二等学业奖学金、第七届全国大学生学术英语词汇竞赛优胜奖等奖项。先后参与国家自然科学基金青年科学基金项目、浙江省农业新品种重大专项花卉育种专项、浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划项目等, 参加2021—2022年中国观赏园艺学术研讨会、2023年整合植物生物学前沿学术研讨会暨JIPB编委会等会议。



通讯作者简介: 辛静静, 博士, 浙江农林大学讲师, 主要从事观赏植物抗逆性等领域的研究。主持或参与国家自然科学基金青年科学基金项目、江苏省自然科学基金青年基金项目3项, 以第一作者在 *Horticulture Research* 等期刊发表3篇论文。