

糜子细菌性条斑病病原菌鉴定 及其对13种杀菌剂的敏感性

白 雪^{1,2} 陈 悅¹ 白庆荣^{1*} 谷 月¹ 孙 蕾¹ 赵廷昌^{3*}

(1. 吉林农业大学植物保护学院, 长春 130118; 2. 吉林省农业科学院植物保护研究所, 公主岭 136100;
3. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193)

摘要: 为有效防治糜子细菌性条斑病, 采用平板划线分离法对2016年自黑龙江省齐齐哈尔市采集的罹细菌性条斑病的糜子植株进行病原菌分离与纯化, 依据柯赫氏法则对其致病性进行测定; 采用Biolog自动微生物鉴定系统、16S rDNA和16S-23S rDNA间隔区序列分析及病原菌的生理生化反应对病原菌进行鉴定; 并测定该病原菌对13种常用杀菌剂的敏感性。结果显示, 从糜子叶片和叶鞘病斑中共分离纯化获得10株培养性状一致的菌株, 经柯赫氏法则验证均为细菌性条斑病病原菌。经Biolog鉴定, 3株代表菌株与标准菌株燕麦噬酸菌 *Acidovorax avenae* 的相似值分别为0.716、0.705、0.723, 序列分析显示, 这3株代表菌株与燕麦噬酸菌燕麦亚种 *A. avenae* subsp. *avenae* 的一致性为99%以上; 该病原菌的革兰氏染色反应及碳源利用等生理生化反应与对照菌株燕麦噬酸菌 ICMP3183表现一致。因此, 确定糜子细菌性条斑病病原菌为燕麦噬酸菌。糜子细菌性条斑病病原菌代表菌株MZ121101对80%乙蒜素乳油、30%乙蒜素乳油及0.3%四霉素水剂的敏感性较高, 抑制中浓度EC₅₀介于389.31~939.94 μg/mL之间, 这2种药剂可作为防治糜子细菌性条斑病的首选药剂。

关键词: 糜子; 细菌性条斑病; 燕麦噬酸菌; 病原菌鉴定; 杀菌剂; 敏感性

Identification of pathogen causing bacterial stripe of millet and its susceptibility to 13 bactericides

Bai Xue^{1,2} Chen Yue¹ Bai Qingrong^{1*} Gu Yue¹ Sun Lei¹ Zhao Tingchang^{3*}

(1. College of Plant Protection, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin Province, China;
2. Institute of Plant Protection, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, Jilin Province, China;
3. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: To control millet bacterial stripe, the method of streaking plate was used to isolate pathogen from the diseased samples that were collected from Qiqihaer City, Heilongjiang Province in 2016. The pathogenicity of the isolates was tested to fulfill by the Koch's postulates. Biolog systematic, sequences analyses of 16S rDNA and 16S-23S rDNA, biochemical and physiological reactions were used in pathogen identification. The sensitivity of representative strain to 13 bactericides was also determined. Ten isolates were obtained from the diseased leaves and sheaths with similar morphology on medium, and were verified as the pathogens of the bacterial stripe of millet. The results of Biolog test showed three representative strains were similar with *Acidovorax avenae* with similarity values of 0.716, 0.705 and 0.723, respectively. Sequences analysis showed that the three representative strains were more than 99% consistent with *A. avenae* subsp. *avenae*. Physiological and biochemical reactions such as Gram staining

基金项目: 中国农业科学院创新工程项目(CAASIPP03)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: bbbqqrrr@163.com, zhaotgcg@163.com

收稿日期: 2018-08-02

and carbon utilization of these isolates were consistent with those of control strain *A. avenae* ICMP3183, thus the pathogen was eventually identified as *Acidovorax avenae*. The MZ121101 strain was sensitive to 80% ethylicin EC, 30% ethylicin EC and 0.3% tetracycline AS, the EC₅₀ of them was 389.31–939.94 μg/mL. The two fungicides could be used to control bacterial stripe of millet in the field.

Key words: millet; bacterial stripe; *Acidovorax avenae*; pathogen identification; bactericide; susceptibility

糜子为禾本科黍属一年生草本植物,是我国重要的粮食作物之一,其籽粒营养丰富,在多样化饮食结构中占有重要位置。糜子主要分布于我国西北、华北、西南、东北、华南以及华东等地山区(赵飞龙,2014)。随着种植业结构调整,杂粮生产备受关注,2006年糜子被列入国家增强粮食生产能力行动计划和国家科技支撑计划中。随着糜子种植面积的不断扩大,病害问题日益突显,如糜子红叶病(吴尔福等,1989)、糜子黑穗病(宗国豪,2017)、糜子白粉病(石甜甜等,2018)及由麦根腐平脐蠕孢 *Bipolaris sorokiniana* 引起的柳枝稷叶斑病(马甲强等,2016)等真菌病害,严重影响其产业的健康发展。2016年8月黑龙江省齐齐哈尔市糜子资源圃所有糜子品种的新老叶片及茎部均发生糜子细菌性条斑病,对糜子生产造成严重危害,国内未见关于此病害的相关报道。

糜子细菌性条斑病病害症状与 Myung et al. (2012)报道的由燕麦噬酸菌燕麦亚种 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* 引起的糜子细菌性条斑病极其相似。燕麦噬酸菌燕麦亚种是重要的植物病原菌,该菌寄主范围广泛,可引起水稻褐色条纹病(Xie et al., 1998)、水稻细菌性褐条病(徐丽慧等,2008; Lai & Huang, 2018)、玉米条斑病(Ji et al., 2014)、甘蔗赤条病(Shan et al., 2017)、谷子细菌性条斑病(Wu et al., 2018)、大鹤望兰细菌性条斑病(Seijo & Peres, 2011)、美人蕉细菌性条斑病(Sanahuja et al., 2018)等。Song et al.(2004)在水稻种子上检测到该病原菌。对于植物细菌病害病原菌的鉴定,一般先通过病原菌的致病性、形态特征、培养性状、生理生化反应等传统方法对其初步鉴定,然后再结合 16S rDNA 和 16S-23S rDNA 序列分析对其病原菌的分类地位进行进一步鉴定。16S rDNA 序列分析是细菌系统发育分类的重要方法,但对近缘细菌种的分辨力不强。16S-23S rDNA 既保守又相对可变,片段较小,重复性好,可用于分辨 16S rRNA 序列无法鉴别的细菌种和种内菌株,是 16S rRNA 序列分析的有利补充(Gürtler & Stanisich, 1996; García-Martínez et al., 1999)。Biolog 鉴定系统根据微生物对不同碳

源的利用情况,检测微生物的特征指纹图谱,该系统具有操作简单、快速、相对准确的特点,常用于病原细菌、真菌、生防细菌、有益真菌等微生物的分类鉴定。如高岩等(2007)采用 Biolog 微生物自动鉴定系统对玉米细菌性条斑病病原菌进行鉴定;徐丽慧等(2008)采用 Biolog 微生物自动鉴定系统对水稻细菌性褐条病病原菌进行鉴定;谢慧婷等(2016)采用 Biolog 微生物自动鉴定系统对甜瓜细菌性果斑病菌进行鉴定;鹿秀云等(2019)采用 Biolog 微生物自动鉴定系统对棉铃疫病生防菌进行鉴定;韩国 Myung et al.(2012)对糜子细菌性条斑病病原菌鉴定时也采用了 Biolog 微生物鉴定方法。梅里埃 API 20NE 微生物生化鉴定系统和脂肪酸甲酯微生物鉴定系统也常用于细菌的快速鉴定,如 Lai & Huang(2018)采用 API 20NE 微生物生化鉴定系统对中国台湾水稻褐条病病原菌进行鉴定。

为明确黑龙江省齐齐哈尔市糜子细菌性条斑病病原菌,本研究拟对其病原菌进行划线分离和纯化,结合致病性测定、Biolog 微生物自动鉴定系统、16S rDNA 和 16S-23S rDNA 间隔区序列分析及病原菌生理生化反应对所获得的分离物进行分类鉴定,并采用抑菌圈法测定该病原菌对 13 种常用杀菌剂的敏感性,筛选出对该病菌具有较好抑制作用的药剂,以期为该病害的有效防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株和植物:2016 年 8 月在黑龙江省齐齐哈尔市糜子资源圃采集罹病糜子植株,糜子品种为公糜 1 号,种子由吉林农业大学牟金明教授提供。烟草品种为 NC89,于吉林农业大学植物保护专业教学实习温室内种植,选取 4 叶期烟草用于分离物的过敏性反应测试。对照菌株为燕麦噬酸菌 ICMP3183 和西瓜噬酸菌 *A. citrulli* ICMP7500,均由中科院植物保护研究所赵廷昌教授提供;对照菌株水稻噬酸菌 *A. oryzae* RS-2,由浙江大学李斌教授提供。

培养基: 营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基: 牛肉膏3 g、蛋白胨10 g、NaCl 5 g、琼脂15 g、蒸馏水1 L, pH 7.0~7.2; 金氏B(King's B, KB)液体培养基: 胰蛋白胨20 g、K₂HPO₄ 1.50 g、MgSO₄·7H₂O 1.50 g、甘油15 mL、琼脂15 g、蒸馏水1 L。

供试药剂: 53.8% 氢氧化铜水分散粒剂、46% 氢氧化铜水分散粒剂, 美国杜邦公司; 85% 波尔·霜脲氰(bordeaux mixture·cymoxanil)可湿性粉剂、77% 硫酸铜钙可湿性粉剂、85% 波尔·甲霜灵(bordeaux mixture·metalaxyl)可湿性粉剂, 江苏龙灯化学有限公司; 70% 碱式硫酸铜水分散粒剂, 美国仙农有限公司; 50% 氯溴异氰尿酸(chloroisobromine cyanuric acid)可溶性粉剂, 河南银田精细化工有限公司; 30% 嘴霉酮(benzothiazolinone)微乳剂, 江苏辉丰农化股份有限公司; 3% 中生菌素(zhongsheng mycin)可湿性粉剂, 华北制药河北华诺有限公司; 2% 春雷霉素(kasugamycin)水剂, 日本北兴化学工业株式会社; 0.3% 四霉素(tetramycin)水剂, 辽宁微创生物工程股份有限公司; 80% 乙蒜素(ethylicin)乳油, 河南科邦化工有限公司; 30% 乙蒜素乳油, 河南中威高科技术有限公司。

试剂及仪器: Taq酶、dNTP、Buffer, 生工生物工程(上海)股份有限公司; GEN III 鉴定板、接种液(inoculating fluid A, IF-A)、Biolog通用培养基(Biolog universal growth agar, BUG), 广州市华粤瑞科科学器材有限公司北京分公司; 革兰氏染色液试剂盒, 珠海贝索生物技术有限公司; 其它试剂均为国产分析纯。D7000数码相机, 日本Nikon公司; T100 PCR仪及Universal Hold II型凝胶成相系统, 美国Bio-Rad公司; GEN III Microstation自动微生物鉴定系统, 美国Biolog公司; GEN III型96孔板, 广州市华粤瑞科科学器材有限公司北京分公司; BPH-9082精密恒温培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; Evolution 300PC分光光度计, 美国赛默飞世尔科技公司; ISH500显微镜, 德国卡尔·蔡司股份公司。

1.2 方法

1.2.1 病害标本的采集与田间症状

2016年8月在黑龙江省齐齐哈尔市糜子资源圃采集罹病糜子植株, 观察叶片和叶鞘上的病斑形态及颜色变化等病害特征, 用数码相机拍照记录。分别剪取罹病叶片、叶鞘, 一部分标本用自封袋带回实验室用于病原菌的分离; 另一部分放置于标本夹内, 标本上下分别放置多层吸水纸, 每天更换2次吸水纸, 直至标本干燥, 置标本袋内, 于标本柜内保存。

1.2.2 糜子细菌性条斑病病原菌分离与纯化

将采集到的新鲜标本及时带回实验室, 于显微镜下观察喷菌现象, 采用平板划线分离法(方中达, 1998)对有喷菌现象的标本进行分离。在标本病健交界处剪取大小为2 mm×3 mm的组织块置于75%乙醇中消毒1 min, 无菌水冲洗3次后剪碎, 放入装有100 μL无菌水的灭菌培养皿中, 静止10 min, 制成菌悬液。用接种环蘸取菌悬液在NA培养基上划线分离后置于相对湿度65%、光周期L 12:D 12、温度28℃的恒温培养箱中培养24~48 h, 观察菌落形态, 分别挑取性状一致的优势菌落进行纯化。将纯化菌株分别接种于NA培养基上, 4℃保存备用。

1.2.3 糜子细菌性条斑病病原菌的致病性测定

将1.2.2分离获得的10株菌株分别接种于NA培养基上, 于相对湿度65%、光周期L 12:D 12、温度28℃的恒温培养箱中培养36 h后挑取单菌落接种于KB液体培养基中, 于220 r/min、28℃条件下培养16~18 h, 制成菌液悬浮液。用分光光度计测定菌液悬浮液于600 nm波长处的吸光度值OD_{600 nm}, 并用灭菌水将细菌悬浮液OD_{600 nm}调至0.3, 即细菌悬浮液的浓度为3×10⁸ CFU/mL, 备用。

将公糜1号种子播种在装有灭菌营养土、直径为20 cm的营养钵中, 每钵播种30粒, 置于相对湿度75%~85%、温度15~28℃、自然光照的日光温室中培养。当糜子苗长到4~5叶时进行疏苗, 剔除弱苗, 每钵保留15株。采用常规喷雾接种方法分别将3×10⁸ CFU/mL细菌悬浮液均匀喷洒在健康糜子苗上, 每钵喷20 mL, 以喷洒等量灭菌水为对照, 喷洒后套袋保湿培养, 3 d后观察并记录发病情况。接种后若健康糜子苗产生与田间症状相似的褐色条斑, 且显微镜下观察到喷菌现象即为发病。每个处理重复3次。从各处理中随机选取接种后发病植株进行病原菌再分离, 分离到的菌株与原接种菌株进行形态及分子序列的比较, 如与原接种菌株相同, 则原接种菌株即为该病原菌。

1.2.4 糜子细菌性条斑病病原菌的Biolog鉴定

采用Gen III型96孔板及Biolog自动微生物鉴定系统对代表菌株MZ121101、MZ121102、MZ121103进行71种碳源利用测试和23种化学敏感性测试。按照Gen III型96孔板及Biolog微生物自动鉴定系统操作说明书将供试菌株在KB培养基上连续转接2~3次后, 再转接到BUG培养基上, 于相对湿度65%、光周期L 12:D 12、温度33℃的恒温培养箱中培养24 h, 用接种棉签蘸取BUG培养基上

的单菌落,转入到 IF-A 接种液中,调整浊度值为 90%~98% 透光率,向每孔 GEN III 鉴定板中加入 100 μL 菌悬液,于相对湿度 65%、光周期 L 12:D 12、温度 33℃ 的恒温培养箱中培养 16~24 h 后,第 1 次读数,培养 25~48 h 后,第 2 次读数,分别记录读数。每株菌株 3 次重复。根据 Biolog 自动微生物鉴定系统测得的相似值和可行性值判断菌株的分类地位。

1.2.5 糜子细菌性条斑病病原菌的分子生物学鉴定

选取代表菌株 MZ121101~MZ121103 进行分子生物学鉴定。采用 CTAB 法(宋国立等,1998)提取待测菌株基因组 DNA。分别利用植物病原细菌 16S rDNA 的通用引物和 16S-23S rDNA 间隔区序列通用引物对获得的病原菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增。16S rDNA 的通用引物为 16F(5'-AGAGTTT-GATCCTTCTCAG-3') 和 1492R(5'-TACGGTTAC-CTTGTACGACTT-3'),16S-23S rDNA 间隔区序列通用引物为 L1(5'-AGTCGTAACAACGTAGCCGT-3') 和 L2(5'-GTGCCAAGGCATCCACC-3'),引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。25 μL PCR 反应体系:10×Buffer 2.5 μL 、2.5 mmol/L dNTP 2 μL 、Taq 酶 0.2 μL 、模板 DNA 1 μL 、25 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 0.5 μL ,加 ddH₂O 至 25 μL 。引物 16F/1492R PCR 扩增条件:95℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,55℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,35 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。引物 L1/L2 PCR 扩增条件:95℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,60℃退火 1 min,72℃延伸 90 s,35 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。扩增产物的纯化和序列测定委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行,所得核苷酸序列与 GenBank(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)核苷酸数据库中的相关序列进行 BLAST 比对。

1.2.6 糜子细菌性条斑病病原菌的生理生化测定

参照格革兰氏染色液试剂盒使用说明对糜子细菌性条斑病病原菌菌株 MZ121101~MZ121110 进行革兰氏染色;参照 Schaad et al.(2011)和方中达(1998)方法对糜子细菌性条斑病病原菌菌株 MZ121101~MZ121110 分别进行接触酶试验、氧化酶试验、乙酰甲基甲醇试验、H₂S 试验、脂产生试验、淀粉水解试验、硝酸盐还原试验、柠檬酸盐利用试验、明胶液化试验、41℃下生长试验及对甘露醇、木糖、山梨醇、蔗糖、D-果糖、乙醇、麦芽糖、阿拉伯醇碳源的利用试验;参照 Schaad et al.(2011)方法进行马铃薯腐败试验,先将马铃薯切成片状,用移菌环将 NA 培养基上培养 24~36 h 的新鲜病原菌菌块接种

到片状马铃薯的切面,于相对湿度 65%、光周期 L 12:D 12、温度 28℃ 的恒温培养箱中保湿培养,每天观察马铃薯腐败情况。所有试验均以燕麦噬酸菌 ICMP3183、西瓜噬酸菌 ICMP7500 和水稻噬酸菌 RS-2 为对照菌株,每株菌株 3 次重复。

烟草过敏性反应试验:用 1 mL 无菌注射器分别吸取不同菌株的菌液悬浮液 0.5 mL,注射到 4 叶期烟草 NC89 叶片背面的肋间组织中,注射面积为 0.5~1.0 cm^2 ,每株菌株在同一叶片注射 3 点,以注射等量灭菌水为阴性对照,重复 3 次,接种后的烟草置于相对湿度 75%~85%、温度 15~28℃、自然光照的日光温室内培养,24 h 后观察烟草叶片的反应。如果接种 24~48 h 内烟草叶片上产生过敏性枯死斑症状的为阳性反应,不产生过敏性枯死斑症状的则为阴性反应。

1.2.7 糜子细菌性条斑病病原菌对杀菌剂的敏感性

选择 MZ121101 为代表菌株进行对不同杀菌剂的敏感性试验。将 NA 培养基上培养 36 h 的 MZ121101 菌株用无菌水洗脱,配制成浓度为 1×10⁶ CFU/mL 的菌悬液,与冷却至 50℃ 的 NA 培养基按 1:20 体积比混匀后制成含菌的 NA 平板培养基。用无菌镊子分别夹取 3 片直径为 6 mm 的单层无菌滤纸片以等边三角形的排列方式置于已经凝固的含菌 NA 平板培养基上;将每种供试药剂按照商品最高和最低推荐剂量设置中间剂量,然后分别上下浮动 2 个剂量配置成 5 个不同浓度,即 80% 乙蒜素乳油浓度分别为 500、400、350、300 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,30% 乙蒜素乳油浓度分别为 1 250、1 000、750、500 和 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$,30% 嘧霉酮微乳剂浓度分别为 5 000、2 500、2 000、1 250 和 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,3% 中生菌素可湿性粉剂浓度分别为 7 500、5 000、2 500、1 000 和 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$,0.3% 四霉素水剂、50% 氯溴异氰尿酸可溶性粉剂、85% 波尔·霜脲氰可湿性粉剂、70% 碱式硫酸铜水分散粒剂、85% 波尔·甲霜灵可湿性粉剂、46% 氢氧化铜水分散粒剂、77% 硫酸铜钙可湿性粉剂、2% 春雷霉素水剂、53.8% 氢氧化铜水分散粒剂浓度分别为 10 000、7 500、5 000、2 500 和 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。用移液器分别吸取 10 μL 不同浓度药液滴至滤纸片上,以滴加 10 μL 无菌水的滤纸片为空白对照,将培养皿置于相对湿度 65%、光周期 L 12:D 12、温度 28℃ 的恒温培养箱中培养 24 h,用十字交叉法测量各处理的抑菌圈直径,计算抑菌率。抑制率=(处理组抑菌圈直径-对照组抑菌圈直径)/处理组抑菌圈直径×100%。以药剂浓度对数值为自变量 x,以抑菌

率的概率值为因变量 y ,建立毒力回归方程,通过毒力回归方程计算各药剂抑制中浓度EC₅₀(唐启义,2002;严婉荣等,2016)。

2 结果与分析

2.1 糜子细菌性条斑病的田间症状

糜子叶片和叶鞘上出现水浸状短条斑,边缘规则,随着病情发展,病斑颜色加深至黄褐色,病斑向纵向及横向扩展,严重时病斑融合,形成大的条状

斑,干燥后成褐色皮状物,致使糜子叶片干枯,最终导致整个植株死亡(图1)。

2.2 糜子细菌性条斑病病原菌的分离与纯化

采用平板划线分离法对新鲜病组织进行分离和纯化后共获得培养性状一致的10株菌株,分别编号为MZ121101~MZ1211010。在NA培养基上生长24~48 h后,10株菌株均形成白色半透明的圆形菌落,稍隆起,边缘整齐,表面光滑(图2-A~C)。



图1 糜子细菌性条斑病的田间发病症状

Fig. 1 Symptoms of millet bacterial stripe in the field

A: 叶片; B: 叶鞘; C: 植株。A: Leaves; B: sheath; C: plant.

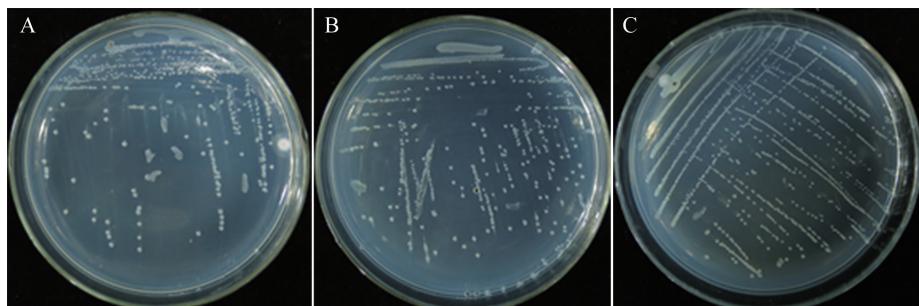


图2 糜子细菌性条斑病病原菌菌株 MZ121101~MZ121103(A~C) 菌落形态

Fig. 2 Colony morphology of MZ121101~MZ121103 (A~C) strain of pathogen causing bacterial stripe of millet

2.3 糜子细菌性条斑病病原菌的致病性

接种后第3天,接种的糜子叶片出现暗绿色油渍状短条斑,接种后第7天,病斑颜色转为褐色条斑,并沿叶脉纵向扩展,发病症状与田间症状基本一

致(图3-A~C),对照植株未见异常(图3-D);对接种发病部位进行病原菌再分离,经形态观察及分子序列分析证实再分离菌株与原接种菌株一致。



图3 糜子细菌性条斑病病原菌菌株 MZ121101~MZ121103(A~C) 的致病性

Fig. 3 Pathogenicity of strains MZ121101~MZ121103 (A~C) of pathogen causing bacterial stripe of millet

D: 对照植株。D: Control plants.

2.4 糜子细菌性条斑病病原菌的Biolog鉴定

经 Biolog 鉴定,代表菌株 MZ121101~MZ121103 与 Biolog 数据库中燕麦噬酸菌的相似值分别为 0.716、0.705、0.723,可能值分别为 0.787、0.782、0.774,故将糜子细菌性条斑病病原菌初步鉴定为燕麦噬酸菌。

2.5 糜子细菌性条斑病病原菌的分子生物学鉴定

利用 16S rDNA 通用引物对代表菌株 MZ121101~MZ121103 的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,获得的核苷酸序列 GenBank 登录号分别为 KY851782、KY797314、KY797315,与 GenBank 中燕麦噬酸菌属中一些种的序列一致性达 99%;利用 16S-23S rDNA 间隔区序列通用引物对代表菌株

MZ121101~MZ121103 的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,获得的核苷酸序列 GenBank 登录号分别为 KY797316、KY797317、KY797318,与韩国糜子细菌性条斑病病原菌燕麦噬酸菌燕麦亚种 BC3207 的序列 (GenBank 登录号 JQ743877) 一致性为 100%,故进一步将糜子细菌性条斑病病原菌鉴定为燕麦噬酸菌亚种。

2.6 糜子细菌性条斑病病原菌的生理生化特性

分离获得的 10 株糜子细菌性条斑病病原菌菌株均与 3 株对照菌株在革兰氏染色反应、乙酰甲基甲醇试验、马铃薯腐败试验、烟草过敏反应、接触酶试验、氧化酶试验、H₂S 产生试验、明胶液化试验及 41℃ 下生长的结果一致,都能利用木糖和 D-果糖(表 1)。

表 1 供试菌株与近似种的生理生化反应测定结果

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of tested strains and related species

测定项目 Test item	糜子细菌性条斑病病原菌菌株 Pathogenic strains causing bacterial leaf streak of millet										对照菌株 Control strains		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	燕麦 噬酸菌 <i>A. avenae</i>	水稻 噬酸菌 <i>A. oryzae</i>	西瓜 噬酸菌 <i>A. citrull</i>
	ICMP3183	RS-2	ICMP7500	ICMP3183	RS-2	ICMP7500							
革兰氏染色 Gram stain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
乙酰甲基甲醇测定 V-P test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
马铃薯腐败试验	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Potato soft rot													
接触酶 Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
氧化酶 Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
烟草过敏反应 Tobacco HR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S 产生 H ₂ S production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41℃ 生长 41℃ growth	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
脂酶产生 Lipase production	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
柠檬酸盐利用 Sodium citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
碳源利用 Carbon source utilization													
甘露醇 Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
木糖 D-xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
山梨醇 Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-果糖 D-fucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
麦芽糖 Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
阿拉伯醇 Arabinol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
蔗糖 Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
乙醇 Ethanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

1~10: 菌株 MZ121101~MZ121110。+: 阳性; -: 阴性。1~10: Strain number MZ121101 to MZ121110; +: positive; -: negative.

对照菌株水稻噬酸菌RS-2不能水解淀粉、不能利用柠檬酸盐,能利用蔗糖和乙醇,但不能利用麦芽糖;对照菌株西瓜噬酸菌ICMP7500的淀粉水解试验、脂酶产生试验和硝酸盐还原试验结果均为阴性,柠檬酸盐利用试验结果呈阳性,能利用乙醇、阿拉伯醇,不能利用甘露醇、山梨醇、麦芽糖和蔗糖;供试菌株MZ121101~MZ121110的脂酶产生试验、硝酸盐还原试验、柠檬酸盐利用试验及淀粉水解试验结果均呈阳性,能利用甘露醇、山梨醇和麦芽糖,不能利用阿拉伯醇、蔗糖和乙醇,与对照菌株燕麦噬酸菌ICMP3183菌株测定结果一致(表1)。

2.7 糜子细菌性条斑病病原菌对杀菌剂的敏感性

在13种杀菌剂中,80%乙蒜素乳油、30%乙蒜

素乳油及0.3%四霉素水剂对MZ121101菌株的EC₅₀最小,分别为389.31、721.90和939.94 μg/mL;50%氯溴异氰尿酸可溶性粉剂、30%噻霉酮微乳剂、3%中生菌素可湿性粉剂、85%波尔·霜脲氰可湿性粉剂、70%碱式硫酸铜水分散粒剂对MZ121101菌株的EC₅₀较小,分别为2 190.68、2 261.74、2 497.57、2 560.47和2 744.63 μg/mL;85%波尔·甲霜灵可湿性粉剂、46%氢氧化铜水分散粒剂、77%硫酸铜钙可湿性粉剂、2%春雷霉素水剂及53.8%氢氧化铜水分散粒剂对MZ121101菌株的EC₅₀最大,分别为5 586.95、6 191.68、8 945.38、9 741.95和10 014.25 μg/mL(表2),表明80%乙蒜素乳油、30%乙蒜素乳油及0.3%四霉素水剂可作为防控该病的首选药剂。

表2 糜子细菌性条斑病病原菌菌株MZ121101对13种供试药剂的敏感性

Table 2 Susceptibility of MZ121101 strain of pathogen causing bacterial stripe of millet to 13 bactericides

药剂 Bactericide	浓度 Concentration (μg/mL)	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (mm)	抑菌率 (%) Inhibition rate	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数r Correlation coefficient	EC ₅₀ (μg/mL)
80%乙蒜素乳油	500	17.0	64.7	$y=13.625x+30.294$	0.882	389.31
80% ethylicin emulsifiable concentrate	400	15.3	60.8			
	350	12.3	51.2			
	300	10.7	43.9			
	200	6.0	0.0			
30%乙蒜素乳油	1 250	20.8	71.2	$y=3.561x+2.995$	0.957	721.90
30% ethylicin emulsifiable concentrate	1 000	17.7	66.1			
	750	15.8	62.0			
	500	9.3	35.5			
	400	7.2	16.7			
0.3%四霉素水剂	10 000	20.8	71.1	$y=0.486x+3.554$	0.974	939.94
0.3% tetramycin aqueous solution	7 500	17.1	64.9			
	5 000	16.1	62.7			
	2 500	14.8	59.4			
	1 000	12.1	50.4			
50%氯溴异氰尿酸可溶性粉剂	10 000	21.3	71.8	$y=0.726x+2.575$	0.973	2 190.68
50% chlorobromoisocyanuric acid soluble powder	7 500	16.0	62.5			
	5 000	14.6	59.1			
	2 500	12.0	50.0			
	1 000	10.3	41.9			
30%噻霉酮微乳剂	5 000	17.8	66.3	$y=1.310x+0.605$	0.967	2 261.74
30% benzoithiazolinone microemulsion	2 500	12.3	51.2			
	2 000	12.0	50.0			
	1 250	10.2	41.2			
	1 000	8.3	27.7			
3%中生菌素可湿性粉剂	7 500	19.1	68.6	$y=1.297x+0.594$	0.920	2 497.57
3% Zhongsheng mycin wettable power	5 000	17.3	65.3			
	2 500	14.1	57.6			
	1 000	10.0	40.0			
	750	7.1	15.9			

续表 2 Continued

药剂 Bactericide	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	抑菌圈直径 (mm) Inhibition zone diameter	抑菌率(%) Inhibition rate	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数r Correlation coefficient	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
85% 波尔·霜脲氰可湿性粉剂	10 000	21.1	71.6	$y=1.047x+1.430$	0.958	2 560.47
85% bordeaux mixture·cymoxanil wettable power	7 500	19.1	68.7			
	5 000	15.0	60.0			
	2 500	14.3	58.1			
	1 000	8.5	29.4			
70% 碱式硫酸铜水分散粒剂	10 000	17.0	64.7	$y=0.603x+2.928$	0.992	2 744.63
70% copper dihydroxosulphate WG	7 500	14.5	58.6			
	5 000	13.8	56.6			
	2 500	11.6	48.5			
	1 000	10.0	40.0			
85% 波尔·甲霜灵可湿性粉剂	10 000	14.0	57.1	$y=1.240x+0.354$	0.971	5 586.95
85% bordeaux mixture·metal-axyl wettable power	7 500	13.7	56.1			
	5 000	13.3	55.5			
	2 500	9.0	33.3			
	1 000	7.1	16.2			
46% 氢氧化铜水分散粒剂	7 500	12.2	52.6	$y=1.823x+1.912$	0.965	6 191.68
46% copper hydroxide water dispersible granules	5 000	10.2	41.0			
	2 500	8.3	27.7			
	2 000	8.0	25.0			
	1 000	6.3	5.0			
77% 硫酸铜钙可湿性粉剂	10 000	12.3	51.2	$y=1.380x+0.453$	0.949	8 945.38
77% copper calcium sulphate wettable power	7 500	12.0	50.0			
	5 000	10.0	40.0			
	2 500	7.0	14.2			
	1 000	6.8	12.1			
2% 春雷霉素水剂	10 000	11.7	48.5	$y=1.126x+0.508$	0.984	9 741.95
2% kasugamycin aqueous solution	7 500	11.3	47.0			
	5 000	10.0	40.0			
	2 500	7.7	21.7			
	1 000	7.0	14.2			
53.8% 氢氧化铜水分散粒剂	10 000	12.3	51.2	$y=1.230x+0.079$	0.995	10 014.25
53.8% copper hydroxide water dispersible granules	7 500	10.3	41.9			
	5 000	9.2	34.8			
	2 500	8.0	25.0			
	1 000	6.7	10.4			

x: 药剂浓度对数值; y: 抑菌率的概率值。x: Logarithm of bactericide concentration; y: probability value of inhibition rate.

3 讨论

本研究首次报道了在黑龙江省齐齐哈尔市糜子资源圃中发现糜子细菌性条斑病,该病害是在糜子上新发现的一种细菌病害,经 Biolog 自动微生物鉴定系统鉴定,该病病原菌为燕麦噬酸菌。本研究采用 16S rDNA 和 16S-23S rDNA 这 2 个基因序列对病原菌进行鉴定,鉴定结果更可靠。参照 Schaad et al. (2008) 方法,结合与近缘种水稻噬酸菌和西瓜噬酸

菌的生理生化特性及碳源利用情况,最终将糜子细菌性条斑病病原菌鉴定为燕麦噬酸菌,与 Myung et al. (2012) 报道的韩国糜子细菌性条斑病病原菌相同。

噬酸菌属是 Willems et al. (1990) 提出的一个新属,Willems et al. (1992) 将先前归为燕麦假单胞菌 *Pseudomonas avenae*、类产碱假单胞菌西瓜亚种 *P. pseudoalcaligense* subsp. *citrulli*、类产碱假单胞菌魔

芋亚种 *P. pseudoalcaligense* subsp. *konjaci* 和卡特莱兰假单胞菌 *P. cattleyae* 的植物病原细菌作为燕麦噬酸菌亚种转移到新的属中, 拉丁学名分别为燕麦噬酸菌燕麦亚种、燕麦噬酸菌西瓜亚种 *A. avenae* subsp. *citrulli* 和燕麦噬酸菌魔芋亚种 *A. avenae* subsp. *konjaci* 和燕麦噬酸菌卡特莱兰亚种 *A. avenae* subsp. *cattleyae*。Schaad et al. (2008) 应用 16S、ITS 序列、DNA/DNA 杂交试验、脂肪酸分析以及一些生理生化反应重新对燕麦噬酸菌属的成员进行比较分析, 认为有些亚种可升级为种级分类单元, 分别为燕麦噬酸菌、西瓜噬酸菌、卡特莱兰噬酸菌 *A. cattleyae*、水稻噬酸菌。但目前在不同的参考文献中, 其写法不一致, 既有亚种的写法, 也有种的写法, 本研究采用 Schaad 提出的关于噬酸菌种级分类单元的拉丁文写法。

目前用于细菌病害防治的药剂较少, 多数采用抗生素或者铜制剂对病害进行防治。本研究选用了 4 种抗生素、6 种铜制剂(复配制剂)、氯溴异氰尿酸和噻霉酮进行糜子细菌性条斑病病原菌的药剂敏感性测试, 其中该病原菌对 80% 乙蒜素乳油、30% 乙蒜素乳油及 0.3% 四霉素水剂的敏感性较高, 有望作为糜子细菌性条斑病的田间防治药剂, 田间防治效果有待进一步试验证实。

参 考 文 献 (References)

- Fang ZD. 1998. Research methods of plant diseases. 3rd edition. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [方中达. 1998. 植病研究方法. 第3版. 北京: 中国农业出版社]
- Gao Y, Hu BS, Wang FX, Liu FQ, Xu ZG. 2007. Identification of causal agent of maize bacterial leaf stripe. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 23(1): 22–25 (in Chinese) [高岩, 胡白石, 王福祥, 刘凤权, 许志刚. 2007. 玉米细菌性条斑病病原细菌的鉴定. 江苏农业科学, 23(1): 22–25]
- García-Martínez J, Acinas SG, Antón AI, Rodríguez-Valera F. 1999. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. Journal of Microbiological Methods, 36 (1/2): 55–64
- Gürtler V, Stanisich VA. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. Microbiology, 142(Pt1): 3–16
- Ji C, Ou J, Xu D, Pan R. 2014. First report of corn bacterial leaf stripe caused by *Acidovorax avenae* in Guangdong Province, China. Plant Disease, 98(10): 1424
- Lai YR, Huang CJ. 2018. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* causing bacteria brown stripe disease of rice in Taiwan. Journal of Plant Pathology, 100(3): 595
- Lu XY, Li BQ, Zhang XY, Guo QG, Ma P, Li SZ. 2019. Screening, identification and evaluation of biocontrol bacteria against cotton boll blight. Journal of Plant Protection, 46(4): 805–815 (in Chinese) [鹿秀云, 李宝庆, 张晓云, 郭庆港, 马平, 李社增. 2019. 棉铃疫病生防细菌筛选、鉴定及制剂防治效果. 植物保护学报, 46(4): 805–815]
- Ma JQ, Yuan QH, Wang Y, Miao LH. 2016. A leaf spot disease of switchgrass caused by *Bipolaris sorokiniana*. Acta Phytopathologica Sinica, 46(4): 569–572 (in Chinese) [马甲强, 袁庆华, 王瑜, 苗丽宏. 2016. 一种由麦根腐平脐蠕孢(*Bipolaris sorokiniana*)引起的柳枝稷叶斑病. 植物病理学报, 46(4): 569–572]
- Myung IS, Choi JK, Wu JM, Lee JY, Yoo HL, Shim HS. 2012. Bacterial stripe of hog millet caused by *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, a new disease in Korea. Plant Disease, 96(8): 1222
- Sanahuja G, Lopez P, Chase AR. 2018. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* causing bacterial leaf stripe of *Canna* sp. in the southeastern United States. Plant Disease, 102(10): 2026
- Schaad NW, Jones JB, Chun W. 2011. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition. Zhao TC, translated. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press (in Chinese) [Schaad NW, Jones JB, Chun W. 2011. 植物病原细菌鉴定实验指导. 第3版. 赵廷昌, 译. 北京: 中国农业科学技术出版社]
- Schaad NW, Postnikova E, Sechler A, Claflin LE, Vidaver AK, Jones JB, Agarkova I, Ignatov A, Dickstein E, Ramundo BA. 2008. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. Systematic & Applied Microbiology, 31(6/7/8): 434–446
- Seijo TE, Peres NA. 2011. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* causing bacterial leaf stripe of *Strelitzia nicolai*. Plant Disease, 95(11): 1474
- Shan HL, Li WF, Huang YK, Wang XY, Zhang RY, Luo ZM, Yin J. 2017. First detection of sugarcane red stripe caused by *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* in Yuanjiang, Yunnan, China. Tropical Plant Pathology, 42(2): 137–141
- Shi TT, He JL, Qin MY, Chen L, Wang HG, Wang RY, Qiao ZJ. 2018. Sequence characteristics and expression analysis of the mildew resistance protein gene (*Mlo*) in glutinous millet. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 38 (10): 49–56 (in Chinese) [石甜甜, 何杰丽, 秦明月, 陈凌, 王海岗, 王瑞云, 乔治军. 2018. 糜子抗白粉病基因(*Mlo*)编码蛋白的序列特征及表达分析. 山西农业大学学报(自然科学版), 38 (10): 49–56]
- Song GL, Cui RX, Wang KB, Guo LP, Li SH, Wang CY, Zhang XD. 1998. A rapid improved CTAB method for extraction of cotton genomic DNA. Acta Gossypii Sinica, 10(5): 273–275 (in Chinese) [宋国立, 崔荣霞, 王坤波, 郭立平, 黎绍惠, 王春英, 张香娣. 1998. 改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA. 棉花学报, 10(5): 273–275]
- Song WY, Kim HM, Hwang CY, Schaad NW. 2004. Detection of *Acidovorax avenae* ssp. *avenae* in rice seeds using BIO-PCR. Jour-

- nal of Phytopathology, 152(11/12): 667–676
- Tang QY. 2002. Practical statistical analysis and its DPS data processing system. Beijing: Science Press (in Chinese) [唐启义. 2002. 实用统计分析及其DPS数据处理系统. 北京: 科学出版社]
- Willem A, Falsen E, Pot B, Jantzen E, Hoste B, Vandamme P, Gillis M, Kersters K, de Ley J. 1990. *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, E. Falen (EF) group 15, EF group 16, and several clinical isolates, with the species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov., and *Acidovorax temperans* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 40(4): 384–398
- Willem A, Goor M, Thielemans S, Gillis M, Kersters K, De Ley J. 1992. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjacii*. International Journal of Systematic Bacteriology, 42(1): 107–109
- Wu EF, Zhang JR, Sun GR, Wang MQ. 1989. On the control measure of the red leaf diseases of maize and millet with TA (TS type) mixture. Acta Agriculturae Shanghai, 5(1): 67–72 (in Chinese) [吴尔福, 张举仁, 孙光荣, 王鸣歧. 1989. TA(TS型)制剂防治玉米、粟红叶病的生理效应. 上海农业学报, 5(1): 67–72]
- Wu ZR, Zhou YY, Tan GJ, Zhang LX. 2018. First report of bacterial leaf stripe caused by *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* on foxtail millet in China. Plant Disease, 102(12): 2632
- Xie GL, Sun XL, Mew TW. 1998. Characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* from rice seeds. Chinese Journal of Rice Science, 12(3): 165–171
- Xie HT, Li ZB, Qin BX, Yan SA, Cui LX, Deng TJ, Cai JH. 2016. Identification of pathogen causing melon bacterial fruit blotch in Guangxi and analysis of its 16S rDNA sequence. Journal of Southern Agriculture, 7(10): 1698–1703 (in Chinese) [谢慧婷, 李战彪, 秦碧霞, 杨世安, 崔丽贤, 邓铁军, 蔡健和. 2016. 广西甜瓜细菌性果斑病病原鉴定及16S rDNA序列分析. 南方农业学报, 7(10): 1698–1703]
- Xu LH, Qiu W, Zhang WY, Li B, Xie GL. 2008. Identification of the causal organism of bacterial brown stripe from rice seedlings. Chinese Journal of Rice Science, 22(3): 302–306 (in Chinese) [徐丽慧, 邱文, 张唯一, 李斌, 谢关林. 2008. 水稻细菌性褐条病病原的鉴定. 中国水稻科学, 22(3): 302–306]
- Yan WR, Xiao M, Zhao ZX, Chen Y, Fu SJ, Xiao TB. 2016. Pathogen identification and bactericide screening of pepper bacterial leaf spot. Plant Protection, 42(5): 205–209 (in Chinese) [严婉荣, 肖敏, 赵志祥, 陈圆, 符尚娇, 肖彤斌. 2016. 辣椒细菌性叶斑病病原鉴定及室内药剂筛选. 植物保护, 42(5): 205–209]
- Zhao FL. 2014. Genetic diversity of broomcorn millet from different ecotype zone in China based on SSR. Master Thesis. Taigu: Shanxi Agricultural University (in Chinese) [赵飞龙. 2014. 基于SSR的不同生态型糜子地理分布及遗传多样性研究. 硕士学位论文. 太谷: 山西农业大学]
- Zong GH. 2017. Identification in field and selection evaluation of broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.) smut resistant resources. Master Thesis. Yangling: Northwest A&F University (in Chinese) [宗国豪. 2017. 糜子抗黑穗病资源田间鉴定与筛选评价. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学]

(责任编辑:张俊芳)