中国水稻科学 (Chinese J Rice Sci), 2008, 22 (3): 302~306
http://www.ricesci.cn

水稻细菌性褐条病病原的鉴定

徐丽慧　邱　文　张唯一　李　斌　谢关林*
(浙江大学 生物技术研究所/水稻生物学国家重点实验室, 浙江 杭州 310029; * 通讯联系人, E-mail: glxie@zju.edu.cn)

Identification of the Causal Organism of Bacterial Brown Stripe from Rice Seedlings

XU Li-hui, QIU Wen, ZHANG Wei-yi, LI Bin, XIE Guan-lin*
(State Key Laboratory of Rice Biology/Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; * *Corresponding author, E-mail: glxie@zju.edu.cn*)

Abstract: For elucidating the brown stripe pathogen of rice and differentiating it from watermelon blotch bacterium, four out of six bacterial strains isolated from the diseased rice seedlings were compared with three standard reference strains of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* and two standard reference strains of *A. avenae* subsp. *citrulli* by the bacteriological tests, colony morphology, pathogenicity, Biolog, FAME analysis, electromicroscope observation and nested-PCR. It has confirmed that *A. avenae* subsp. *avenae* is the causal agent of bacterial brown stripe of rice. The results also showed that FAME analysis misidentified some strains of *A. avenae* subsp. *avenae* as *A. avenae* subsp. *citrulli* whereas Biolog and the nested PCR were the best way for distinguishing the two bacterial pathogens.

Key words: bacterial brown stripe of rice; phenotypic identification; electromicroscope observation; nested polymerase chain reaction; *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*; *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

摘　要：为明确从褐条病稻苗上分离出来的病原细菌并与西瓜果斑病菌相区分，对该病原特性进行了研究。分离获得6株褐条病致病菌，其中4株经主要细菌学特性、菌落形态、致病性、Biolog、脂肪酸分析 (FAME)、电镜观察、Nested-PCR鉴定及与3株水稻细菌性褐条病标准菌株和2株西瓜果斑病标准菌株的比较，证实了该病是由单极鞭革兰氏阴性细菌 *Acidovorax avenae* ssp. *avenae* 引起的。FAME将水稻细菌性褐条病菌误鉴定为西瓜果斑病菌，而用Biolog和nested-PCR鉴定能得到准确的鉴定结果。

关键词：水稻细菌性褐条病；表型鉴定；电镜观察；巢式聚合酶链式反应；褐条病病菌；西瓜果斑病菌
中图分类号：Q939；S435.111.4+9　　文献标识码：A　　文章编号：1001-7216(2008)03-0302-05

在我国，由于不少教科书上的水稻细菌性褐条病病原是黍假单胞菌 [*Pseudomonas panici* (Elliott) stapp][1]，虽然该病原已于1978年被国际细菌命名委员会改名为丁香假单胞菌黍致病型 [*Pseudomonas syringae* pv. *panici* (Elliott)]，但至今不少南方省 (区) 一直沿用 *P. panici*[2,3]。Xie等[4]首次在国内变褐的稻种上分离到 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*，并鉴定为水稻细菌性褐条病病原，同时发现浙江南部的稻种上带有较高频率的褐条病病菌[5]，但在大田一直未观察到苗期症状。2005年4月我们在浙江省金华市婺城区的杂交水稻秧苗上发现了较严重的水稻细菌性褐条病症状。为搞清该病是由 *P. syringae* pv. *panici* 还是由 *A. avenae* ssp. *avenae* 引起，采用了以前水稻细菌性褐条病病原鉴定的Biolog和脂肪酸分析鉴定等方法，得到了与文献[4]同样的鉴定结果。然而，我们发现，当水稻细菌性褐条病菌与西瓜果斑病菌 (*A. avenae* ssp. *citrulli*) 一起测定时，前者也可能被鉴定为 *A. avenae* ssp. *citrulli*。由 *A. avenae* ssp. *avenae* 引起的水稻细菌性褐条病的研究主要集中在20世纪80年代的日本[6]，但由于该病发生不严重，在病原学研究方面国内外至今仍停留在传统的生理生化和光学显微镜观察水平上[7]，国内至今未见水稻细菌性褐条病的分子生物学鉴定。为有效监控该病害的扩展蔓延，准确鉴别水稻细菌性褐条病菌和我国的植物检疫性有害生物西瓜果斑病菌，我们对该病原做了深入研究。

1　材料与方法

1.1　标准菌株

3株水稻褐条病病菌 (A. avenae ssp. *avenae*) 标准菌株 LMG2117、LMG2118、IRRI01837 和1株水稻细菌性叶鞘褐腐病菌 (P. fuscovaginae) LMG2192 分别由比利时根特大学国家菌种收藏中心 (LMG) 和国际水稻研究所 (IRRI) 提供。2株西瓜果斑病菌 (A. avenae ssp. *citrulli*) 标准菌株

收稿日期：2007-08-09；修改稿收到日期：2008-01-21。
基金项目：国家自然科学基金资助项目 (30671397)。
第一作者简介：徐丽慧 (1983—)，女，硕士研究生。

Aac 和 Njf4 分别由福建农林大学胡方平教授和南京农业大学许志刚教授提供。CB97058 菌分离自水稻细菌性褐条病病种。

1.2 病原分离、细菌学及致病性测定

取水稻褐条病发病初期稻苗植株，将镜检有喷菌现象的叶片直接进行划线分离[8]。菌落形态、培养性状、烟草过敏性反应及生理生化测定按 Mew 等[8,9]方法进行。致病性测定采用注射和喷雾接种法，把感病品种 IR8 种子用 70%酒精处理 1 min 后用蒸馏水洗净，稀播于盆钵中，土壤为高压灭菌的水稻土。把所测菌株配成细菌群落总数（CFU）为 1×10^8 个/mL 的悬浮液，生长 4 周后的秧苗用于注射接种，在秧苗茎基部由下而上注射，每苗注射 0.6 mL，保湿 1 d。喷雾接种在秧苗 3 叶期进行，浓度与保湿同注射接种。

1.3 电镜观察

将培养 1 d 的水稻褐条病菌用无菌水制成菌悬液并过滤，在滤液中加入几滴固定液（pH 7.2，0.15%的戊二醛磷酸缓冲液），离心收集菌体，制成菌悬液，加几滴新鲜的戊二醛，在 4℃冰箱内固定过夜，次日离心，收集菌体，再用无菌水制成菌悬液，并调整菌液浓度为 $1\times10^8\sim1\times10^9$ 个/mL。取等量的最终菌悬液与等量的 2%的钨酸水溶液混合染色，制成混合菌染色液。用无菌毛细吸管吸取混合菌悬液滴在铜网膜上，3～5 min 后，用滤纸吸去余水，待样品干燥后，置透射电子显微镜下观察（TEM，KYKY-1000B，Japan）。

1.4 Biolog 鉴定

分离的菌株经菌落形态、细菌学及致病性测定后，其中 4 株用 Biolog（Biolog Inc.，3447 Investment Blvd.，Suite 3，Hayward，CA 94545，USA）进行证实。在含 95 个碳源的 Biolog 阴性（GN）微孔板中，每孔加入 150 μL 所测细菌悬浮液（OD 值 0.28）。在 30℃下培养 24 h 后由 Biolog 读数机测得反应结果，并直接进入 Biolog 专用细菌鉴定程序（4.1 版本）。具体操作参照谢关林[9]的方法。

1.5 脂肪酸（FAME）鉴定

脂肪酸鉴定采用全自动微生物鉴定系统——美国 Agilent 6890 型气相色谱系统。参照 MIDI 公司说明书上的方法进行。所有纯化的参试菌株先在 NA 培养基上于 28℃下生长 24 h 后，转入含 3%胰蛋白酶的 TSBA 固体培养基上再培养 24 h。然后用直径 4 mm 的无菌塑料接种环挑取一环培养菌放入有螺帽的试管中，提取脂肪酸。鉴定结果通过专化的微生物鉴定系统软件——美国 MIDI 公司开发的基于细菌细胞脂肪酸成分鉴定细菌的 MIS4.5（microbial identification system）和 LGS 4.5（library generation software）获得。把分析结果与数据库中储存的标准菌种的脂肪酸信息进行比对。

1.6 Nested-PCR 分析

采用 3 条 *Acidovorax avenae* ssp. *avenae* 特异性引物[10]对 2 株分离的代表菌株和标准菌株进行 Nested-PCR 扩增，Aaaf3：5′-GTCATC CTCCACC AACCAAG-3′；Aaaf5：5′-TGCCCTGCGGTAGG GCG-3′；Aaar2：5′-AGAACAATTCGTCATTAT GAAG-3′。

扩增反应用的 25 μL 体系包括：10×PCR buffer 2.5 μL，1.5 mmol/L $MgCl_2$，200 μmol/L dNTPs，4 pmol Aaaf3，4 pmol Aaar2，1 U *Taq* DNA 聚合酶，2 μL DNA 模板。反应采用热启动：94℃下预变性 10 min；94℃、53℃、72℃下各 30 s，共 25 个循环；72℃下延伸 7 min。取 1 μL 产物作为 DNA 模板，94℃下预变性 5 min；94℃、60℃、72℃下各 30 s，共 3 个循环；94℃、48℃、72℃下各 30 s，也是 3 个循环；94℃、53℃、72℃下各 30 s，共 25 个循环；最后 72℃下延伸 7 min。取 5～10 μL PCR 产物在 1.2%琼脂糖凝胶中电泳，EB 染色 20 min，紫外观察结果。

2 结果与分析

2.1 水稻细菌性褐条病病害症状

从浙江省金华市发生水稻细菌性褐条病的杂交水稻秧苗上分离到 6 个菌株，经注射接种稻苗，2～3 d 后叶鞘变褐，逐渐枯死；喷雾接种稻苗 11～14 d 后产生与田间相同的褐条症状（图 1）。叶片发病，可先在叶鞘上见不规则的水渍色，后转酱褐色，从叶鞘沿主脉向叶尖延伸，主脉变为明显的褐条，叶色转水黄色，变褐扭曲枯死，叶鞘处朽烂。发展至全株时，表现为缩蔸死亡或全株死亡。未完全枯死的植株，继续分蘖，但明显矮缩，生育期滞后。

2.2 水稻细菌性褐条病细菌学及形态特征

从 6 株分离到的水稻细菌性褐条病菌中选择 4 株进行细菌学特征和电镜观察，结果表明，它们均为革兰氏染色阴性反应，菌体短杆状，不成串，具 1 根极鞭（图 2），大小为（0.93～2.5）μm×（0.5～0.7）μm，能游动，好气性，不产生芽孢。在 NA 培养基上于 28℃下生长 48 h，菌落灰白至暗褐色，平滑有光泽，湿润而呈黏液状，直径2～3mm。KMB培养基



图1 水稻细菌性褐条病危害症状

Fig. 1. Symptom of bacterial brown stripe of rice.

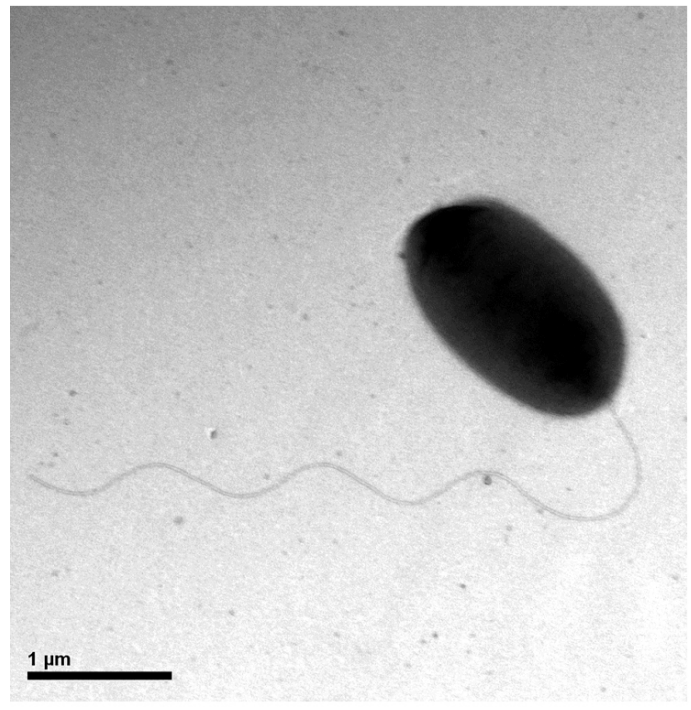


图2 水稻细菌性褐条病菌个体透射电镜照(×30 000)

Fig. 2 Electron microphotograph of individual cell of *A. avenae* ssp. *avenae*(×30 000).

上不产生荧光色素。接种24 h后在烟草上均产生明显的过敏反应。

2.3 Biolog鉴定结果

3株水稻细菌性褐条病菌标准菌 *A. avenae* ssp. *avenae*,2株西瓜果斑病菌 *A. avenae* ssp. *citrulli*标准菌株和1株水稻细菌性叶鞘褐腐病菌 *P. fuscovaginae*标准菌株的Biolog相似性分别为0.701～0.732、0.723～0.731和0.854,均与原鉴定结果一致;分离自稻种的CB97058菌及分离自褐条病稻苗的A1、A2、A3和A6菌的Biolog相似性分别为0.796、0.836、0.651、0.715和0.810(表1),接近或超过标准菌株,具有很高的可信度。

2.4 FAME鉴定结果

FAME鉴定结果匹配程度遵循Buyer等[11]的原则:相似性系数<0.2,结果不可用;相似性系数≥0.2,鉴定到属;相似性系数≥0.5,鉴定到种。3株水稻细菌性褐条病菌标准菌株中2株与原结果一致,IRRI01837被鉴定为西瓜果斑病菌 *A. avenae* ssp. *citrulli*;2株西瓜果斑病菌标准菌株和1株水稻细菌性叶鞘褐腐病菌标准菌株的FAME分析与原鉴定结果吻合;4株水稻褐条病分离菌A1、A2、A3、A6的鉴定结果与Biolog不同,均被鉴定为西瓜果斑病菌(表2),FAME相似性分别为0.582、0.711、0.595、0.706。这表明部分水稻细菌性褐条病菌的鉴定结果与西瓜果斑病菌混淆,FAME分析难以得到准确的鉴定结果。

2.5 Nested-PCR鉴定结果

利用水稻褐条病特异性引物对其中2株水稻分离菌和2个标准菌株的Nested-PCR扩增结果显

表1 水稻细菌性褐条病病原的Biolog鉴定结果

Table 1. Biolog identification of the causal organism of bacterial brown stripe of rice.

菌株代号 Strain code	原鉴定结果 Original identity	产生荧光 Fluorescence	Biolog鉴定结果 Biolog identity	Biolog相似性 Biolog similarity
LMG2117	*A. avenae* ssp. avenae	－	*A. avenae* ssp. avenae	0.701
LMG2118	*A. avenae* ssp. avenae	－	*A. avenae* ssp. avenae	0.732
IRRI01837	*A. avenae* ssp. avenae	－	*A. avenae* ssp. avenae	0.728
Aac	*A. avenae* ssp. citrulli	－	*A. avenae* ssp. citrulli	0.723
Njf4	*A. avenae* ssp. citrulli	－	*A. avenae* ssp. citrulli	0.731
CB97058	－	－	*A. avenae* ssp. avenae	0.796
A1	－	－	*A. avenae* ssp. avenae	0.836
A2	－	－	*A. avenae* ssp. avenae	0.651
A3	－	－	*A. avenae* ssp. avenae	0.715
A6	－	－	*A. avenae* ssp. avenae	0.810
LMG2192	*P. fuscovaginae*	＋	*P. fuscovaginae*	0.854

“＋”指有荧光;“－”指无荧光。表2同。

“＋”, Fluorescent; “－”, Non fluorescent. The same as in Table 2.

表 2 水稻细菌性褐条病病原的脂肪酸鉴定结果

Table 2. FAME identification of the causal organism of bacterial brown stripe of rice.

菌株代号 Strain code	原鉴定结果 Original identity	产生荧光 Fluorescence	FAME 鉴定结果 FAME identity	FAME 相似性 FAME similarity
LMG2117	*A. avenae* ssp. avenae	−	*A. avenae* ssp. avenae	0.827
LMG2118	*A. avenae* ssp. avenae	−	*A. avenae* ssp. avenae	0.848
IRRI01837	*A. avenae* ssp. *avenae*	−	*A. avenae* ssp. *citrulli*	0.586
Aac	*A. avenae* ssp. citrulli	−	*A. avenae* ssp. *citrulli*	0.762
Njf4	*A. avenae* ssp. *citrulli*	−	*A. avenae* ssp. *citrulli*	0.712
CB97058	−	−	*A. avenae* ssp. avenae	0.602
A1	−	−	*A. avenae* ssp. citrulli	0.582
A2	−	−	*A. avenae* ssp. citrulli	0.711
A3	−	−	*A. avenae* ssp. citrulli	0.595
A6	−	−	*A. avenae* ssp. citrulli	0.706
LMG2192	*P. fuscovaginae*	+	*P. fuscovaginae*	0.659

示，2 株水稻分离菌和水稻褐条病标准菌株用外在引物在 262 bp 位置均有扩增条带（图 2-A），用内在引物在 241 bp 位置均有扩增条带（图 2-B）；而西瓜果斑病标准菌株及空白对照均无条带出现。在 Biolog 测定中水稻分离菌 A1 和 A2 被鉴定为 *A. avenae* ssp. *avenae*，但在 FAME 分析中它们被定为 *A. avenae* ssp. *citrulli*，而通过 Nested-PCR 得到了确证。

3 讨论

本研究是在 1998 年稻种褐条病菌研究的基础上[5]，对 2005 年浙江省金华市大田发生的水稻细菌性褐条病所做的深入研究。通过对病原主要细菌学特性、菌落形态、致病性、Biolog、FAME、电镜观察、Nested-PCR 鉴定及与多个标准菌株的比较，明确了该病是由 *A. avenae* ssp. avenae 引起的。然而，我们发现它在菌体、菌落、表形特征等方面与西瓜果斑病菌 *A. avenae* ssp. citrulli 非常相近，使用 FAME 分析，我国的几个 *A. avenae* ssp. avenae 菌被鉴定为西瓜果斑病菌，通过 Biolog 和 Nested-PCR 法才得到准确鉴定。我们的研究表明 *A. avenae* ssp. avenae 和 *A. avenae* ssp. citrulli 两个种间存在很高的同源性。李斌[12] 的研究也证明了这一点。来自欧洲的 2 株 *A. avenae* ssp. avenae 菌与我们从水稻上分离的菌株在 FAME 分析中表现不同。这一结果也证实了段永平等[7] 的推测；即 *A. avenae* ssp. *avenae* 由于可侵染多种禾本科作物而存在较大差异。该菌的遗传及生态多样性有待进一步研究。

Webster 等[13] 认为 *A. avenae* ssp. *avenae* 和

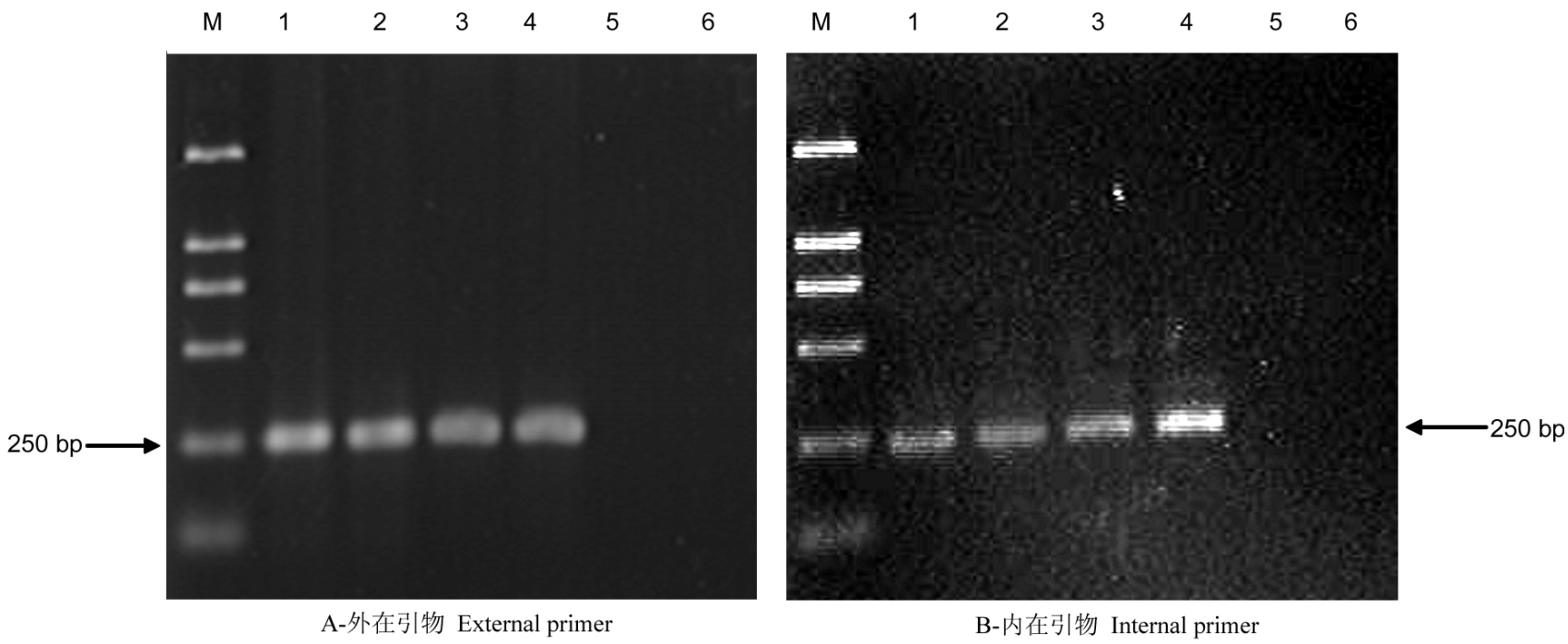


图 3 水稻褐条病菌的 Nested-PCR 鉴定

Fig. 3. Nested-PCR analysis of bacterial stripe pathogen of rice.

M－标准分子量；泳道 1～6 分别为 A1、A2、LMG2117、LMG2118、西瓜果斑病菌 Aac 和无菌水对照。

M, Marker of standard molecular weight; Lanes 1 to 6, A1, A2, LMG2117, LMG2118, reference strain Aac of *A. avenae* ssp. *citrulli* and the water control, respectively.

和 *P. syringae* pv. *panici* 均可引起水稻细菌性褐条病。洪剑鸣等[14] 曾在 20 世纪 70～80 年代对该病做过不少调查研究, 指出由 *P. syringae* pv. *panici* 引起的水稻褐条病可出现 3 种病害症状:普通型 (即本文所描述的症状)、伸长型和心腐型。虽然他们由于当时的条件限制而没有对病原做深入研究, 但有两点可以肯定它与 *A. avenae* ssp. *avenae* 引起的稻褐条病有明显差别:一是病原特性差别, *P. syringae* pv. *panici* 是荧光菌而 *A. avenae* ssp. *avenae* 不是;二是症状差别, 前者的病组织具有难闻的恶臭而后者没有。我国至今未见由 *P. syringae* pv. *panici* 引起的水稻细菌性褐条病病原鉴定报告, 它与 *A. avenae* ssp. *avenae* 等病原细菌在致病特性等方面到底有何异同也有待深入调查和研究[15]。

参考文献:

[1] 中国农业科学院植物保护研究所. 中国农作物病虫害. 2 版. 北京:中国农业出版社, 1995:29-31.

[2] 颜曰红, 蔡方义, 黄贤华. 水稻细菌性褐条病的发生与防治. 农业科技通讯, 2006, 3 (1):19.

[3] 李俊平, 朱文华. 水稻细菌性褐条病的发生及防治. 贵州农业科学, 2003, 31 (2):34-36.

[4] Xie G L, Sun X L, Mew T W. Characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* from rice seeds. *Chinese J Rice Sci*, 1998, 12 (3):165-171.

[5] 谢关林, 朱国念, 任小平. 浙江水稻稻种病原细菌多样性研究. 植物病理学报, 2002, 32 (2):114-120.

[6] Tominaga T. Bacterial brown stripe of rice in nursery box, caused by *Pseudomonas avenae*. *Ann Phytopath Soc Japan*, 1983, 49:463-466.

[7] 段永平, 陈 宾, 王金生, 等. 禾谷类作物细菌性褐条病病原菌的鉴定. 植物病理学报, 1986, 16 (4):228-235.

[8] Mew T W, Misra J K. A Manual of Rice Seed Health Testing. Manila: International Rice Research Institute, 1994:29-46.

[9] Xie G L. Comparison of the methods for identification of pathogenic bacteria of rice. *J Zhejiang Univ: Agric & Life Sci*, 2000, 26 (4):353-358.

[10] Song W Y, Kim H M, Hwang C Y, et al. Detection of *Acidovorax avenae* ssp. *avenae* in rice seeds using BIO-PCR. *J Phytopath*, 2004, 152:667-676.

[11] Buyer J S, Roberts D P, Russek C E. Soil and plant effects on microbial community structure. *Can J Microbiol*, 2002, 48 (11):955-964.

[12] 李 斌. 甜瓜、西瓜上一种新细菌病害的病原鉴定、检测与风险分析 [学位论文]. 南京:南京农业大学, 2002.

[13] Webster R K, Gunnell P S. Compendium of Rice Diseases. Saint Paul, MN: APS Press, 1992:7-8.

[14] 洪剑鸣, 童贤明, 徐福寿. 中国水稻病害及其防治. 上海:上海科学技术出版社, 2006:167-171.

[15] 张立新, 宋幼良, 罗远婵, 等. 水稻根围和人体洋葱伯克氏菌的基因型比较. 中国水稻科学, 2007, 21 (4):431-435.