

Enterobacter spp.: 引起“桑枯萎”病的新证据

朱勃^①, 王国芬^①, 谢关林^{①*}, 周勤^②, 徐福寿^③, Praprat Kawicha^①, 李斌^①, 陈建锋^①

① 水稻生物学国家重点实验室, 浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029;

② 浙江省农业厅经济作物管理局, 杭州 310029;

③ 杭州市植保土肥总站, 杭州 310020

* 联系人, E-mail: glxie@zju.edu.cn

收稿日期: 2008-08-18; 接受日期: 2008-12-02

国家自然科学基金(批准号: 30871655 和 30671397)、国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AA10A211)、浙江省三农五方项目(批准号: 浙农计发 2008-97)和杭州市科技局及杭州市农业发展基金(批准号: 2008-3)资助项目

摘要 从浙江省杭州地区“桑枯萎”病树上分离获得 36 株病原细菌, 通过对 6 株代表菌的常规细菌学、电子显微镜观察、致病性及 Koch 氏假说测定、Biolog 鉴定、脂肪酸分析、生理生化、ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR) 分析、16S rRNA 序列分析, 同时与肠杆菌属(*Enterobacter*)中与植物有关的 7 个模式种菌株和其他 3 株参考菌株的比较, 确认“桑枯萎”病为肠杆菌属中 1 个以上的新种(*Enterobacter* spp.)所引起。“桑枯萎”病是一种国内外尚未报道的桑树新病害, 是 *Enterobacter* spp. 引起植物病害的又一新证据。该研究结果不但对桑树病害的治理具有实际意义, 而且对深入研究 *Enterobacter* 中的人体条件致病菌及环保菌具有重要的学术价值。

关键词

桑枯萎病

Enterobacter

表型鉴定

ERIC-PCR

16S rRNA 鉴定

肠杆菌属(*Enterobacter*)细菌到目前为止已报道了 21 个种和 2 个亚种(<http://www.bacterio.cict.html>)。与肠杆菌科中能引起人类伤寒的伤寒沙门氏菌^[1] (*Salmonella typhi*)及能造成作物大量减产的欧文氏菌^[2] (*Erwinia*)相比要少得多。但是, 近 10 年来 *Enterobacter* spp. 作为一种新的人体致病菌及食品安全的潜在危险菌, 越来越受到科学界的关注^[3,4]。然而, 肠杆菌属细菌对植物致病性的研究甚少, 到目前为止发现的植物上的致病菌只有 5 个种^[5,6]。而在有史以来所记载的百余种桑树病害中, 国内外至今尚无 *Enterobacter* spp. 引起桑病的记录。

中国是蚕桑大国, 每年蚕丝出口创造了大量的外汇, 而桑树是家蚕唯一的食物来源, 因此, 桑树的一些流行病害也受到学者的广泛关注。2006 年上半年

在浙江杭嘉湖的桑树主栽区桐庐、临安等县(市)发现一严重的病害, 幼龄桑发病初期由枝条上叶片开始呈失水状, 继而全株叶片凋萎、枯焦, 直至脱落; 剥开主干皮层, 可见木质部褐色条状斑; 病株根部外观正常, 但木质部严重变褐。桑农在夏伐整枝后出现大批枯死现象。从桑园的发病情况与病株的症状看, 初步诊断为细菌病害, 且与桑青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的症状较为相似。随着采集样本的增多及对病原的深入研究, 发现绝大多数枯萎病株不是由 *R. solanacearum* 引起。到目前为止, 国内外报道的桑树细菌病害有 8 种, 分属于植物细菌中的 6 个属(*Erwinia*, *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Phytoplasma*, *Xanthomonas* 和 *Xylella*)^[7-9]。然而, 在仔细观察后发现上述不少桑树“枯萎”病株, 其发病症状不同于国内外现

已报道的细菌病害, 虽说该病的一些症状特征类似于桑青枯病, 但显著的差别是该病一般始于桑树下部叶片, 幼桑上尤为明显, 病叶枯萎后由下而上脱落, 造成光杆。准确诊断病原是有效治理新病害的关键, 为明确这一严重的桑“枯萎”病究竟由哪种微生物引起, 我们需对该病的病原作一深入的研究。

1 材料与方法

1.1 标准菌株

肠杆菌属中与植物有关的 7 个模式种菌株 *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* LMG2683^T(分离自白杨)、*E. cancerogenus* LMG2693^T(分离自玉米)、*E. pyrinus* LMG22970^T(分离自梨树)、*E. amnigenus* LMG2784^T(分离自土壤)、*E. turicensis* LMG23730^T(分离自水果粉)、*E. helveticus* LMG23732^T(分离自水果粉)、*E. nimipressuralis* LMG10245^T(分离自榆树)及 2 株有关的参考菌株 *E. agglomerans* LMG2557(分离自西洋梨)和青枯病菌模式菌株 *R. solanacearum* LMG2299^T 均由比利时根特大学国家菌种保藏中心 Swings J 教授等提供; 桑青枯病参考菌株 *R. solanacearum* ZJUM19981 由浙江大学生物技术研究所提供。

1.2 病原细菌的分离

从病区获得桑树病样 22 份, 每一样本首先用自来水冲洗干净, 剪成小段后用 70% 的酒精表面消毒 1 min, 剥去根或茎外层表皮取木质部变褐部分, 经表面消毒后用无菌水浸泡 10 min, 在 NA 和 KMB 培养基上划线分离, 平板在 30℃ 下培养 2 天后于 365 nm 波长紫外光下观察, 挑取代表菌落, 在 TTC (triphenyl tetrazolium chloride) 培养基上作鉴别培养并纯化备用^[10]。

1.3 病原的常规细菌学及过敏性反应与致病性测定

菌落形态、培养性状及烟草过敏性反应测定按 Clement 等人^[11] 方法; 生理生化测定按 Schaad 等人^[12] 方法。桑离体致病性测定参照徐丽慧等人^[13] 离体培养的方法进行。桑树幼苗的致病性测定品种为浙江品种“湖桑”, 将所测菌株浓度调节到 10⁸ CFU/mL, 采用针刺法在盆栽桑苗距泥土 10 cm 的主杆上接种, 10 天后开始记录发病情况。接种发病后按照 Koch 氏假说, 重新分离获得相同病原。

1.4 病原细菌的电子显微镜观察

将培养 2 天的病原细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 10⁸ CFU/mL。取等量的最终菌悬液与等量的 2% 的锇酸水溶液混合染色, 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, 经 4 min 后, 用滤纸吸去余水, 待样品干燥后, 置透射电子显微镜 (TEM, KYKY-1000B, Japan) 下观察^[12]。

1.5 病原的 Biolog 鉴定

选取有代表性的菌株, 用 Biolog 测定生化特征: 在含 95 种碳源的 Biolog GN 微孔板中, 每孔加入 150 μL 所测细菌悬浮液 (*A* 值 = 0.3)。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等人^[15] 的方法。

1.6 病原的脂肪酸(FAME)鉴定

FAME 鉴定: 脂肪酸鉴定采用美国 Agilent 6890 型气相色谱系统。参照 MIDI 公司说明书 (MIS operating manual Nov. 2005) 的方法进行。所有纯化的参试菌株先在 NA 培养基上于 30℃ 生长 24 h 后, 转入 TSBA 固体培养基上再培养 24 h。然后用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 MIS6.0 (microbial identification system) 和 LGS6.0 (library generation software) 获得。把分析结果与数据库中标准菌种的脂肪酸信息进行比对。

1.7 病原的 16S rRNA 鉴定

细菌 DNA 的提取方法参照 Harald Hoffmann 等人^[16] 的方法进行, 16S rRNA 细菌通用引物: P0: 5'-AGAGTTGATCATGGCTCAG-3'; P6: 5'-ACGGT TACCTTGTACGACTT-3^[16], PCR 反应根据标准程序进行 (PTC-200, MJ Research)。引物合成及 PCR 反应产物测序由上海生工生物工程有限公司进行, 测序结果登录 GenBank, 登录号为 EU430750~EU430755 共 6

个, 测序后得到的序列与国际核糖体RNA数据库 RDP^[17](<http://rdp.cme.msu.edu/>) 的 *Enterobacter* spp. 16S rRNA序列进行对比.

1.8 ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR) 鉴定

ERIC-PCR反应的引物为ERIC-1: 5'-ATGTAAG CTCCTGGGGATTCAC-3'; ERIC-2: 5'-AAGTAAGTG ACTGGGGT GAGCG-3'^[18], 总反应体系为 30 μL^[15], 其中 500 pmol浓度的引物、200 μmol/L浓度的dNTP 混合物、10 mmol/L Tris-Cl (pH 8.3)、5 mmol/L KCl、1.5 mmol/L MgCl₂以及 2.5 U的Taq聚合酶; PCR反应条件为 10 min 95°C的预变性, 然后为 95°C 1 min, 45°C 1 min, 72°C 1 min 共 35 个循环, 最后 72°C 延伸 15 min. PCR 产物经过 3%的琼脂糖电泳, 最终利用 Golden-View 进行染色, 在紫外下进行观察.

1.9 系统发育分析

核苷酸序列利用CLUSTAL X^[19]进行联配, 联配后的结果用BIOEDIT^[20]进行编辑, 利用MEGA4.0^[21]构建由核苷酸序列生成的系统发育树, 参数是利用 Neighbour-Joining^[22]的算法, 通过 1000 次Bootstrap 抽样及最大似然组成模型(maximum composite likelihood method)^[23].

2 结果和分析

2.1 病原细菌的细胞形态与菌落培养性状

从“枯萎”的桑树上分离获得病原细菌 36 株, 选

出 6 株代表菌株进行细胞形态与菌落培养性状测定. 它们的革兰氏染色反应均为阴性, 菌体短杆状, 能游动, 大小为(0.3~1.0) μm×(0.8~2.0) μm, 在透射电子显微镜下观察, 菌体两端圆, 着色较深, 周生鞭毛(图 1).

6 株代表菌株培养性状表明, 它们在 KMB 培养基上不产生荧光色素; 不产生芽孢; 兼性厌氧; 在 TTC 鉴别培养基上菌落初为红白色, 后呈半透明的深粉红色, 外围的白色部分较小, 菌落表现为: 平滑, 均匀, 边缘清晰、规则, 紫色到深紫色菌落, 外围有一透明或半透明圈. 而植物青枯病菌 *R. solanacearum* 的 2 株参考菌株 LMG 2299^T 和 ZJUM19981 的菌落在 TTC 培养基上则与上述特征完全不同, 菌落白色, 严格好氧, 中间呈淡红色, 边缘不规则, 流动状.

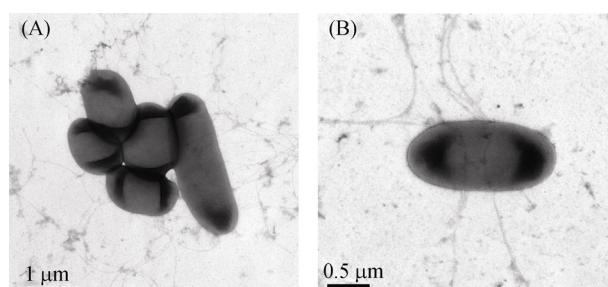


图 1 *Enterobacter* sp. (ZJUPD2) 的菌体形态及鞭毛着生
透射电子显微镜 30000×, (A) 为群体, (B) 为个体

2.2 病原细菌的生理生化反应

6 株桑“枯萎”代表菌株与 3 株参考菌株的主要生理生化反应结果表明(表 1), *Enterobacter* spp. 菌与 *R.*

表 1 6 株桑“枯萎”致病菌与 3 株参考菌的主要生理生化反应比较结果^{a)}

测试项目	参考菌株			6 株桑“枯萎”代表菌株					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
VP 实验 Voges-proskauer	+	+	-	+	+	+	+	+	+
MR 实验 Methylred test	-	-	-	-	-	-	-	-	-
吲哚 Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+	-	+	+	+	+	+	+
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	+	-	+	+	+	+	+	+
脲酶 Urease	w	w	+	w	w	w	w	w	w
过氧化氢酶反应 Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	+	+	-	+	+	+	+	+	+
脱氧核糖核酸酶 Deoxyribonuclease	+	+	+	+	+	+	+	+	+

a) 1~3 为参考菌株 *E. cancerogenus* LMG2693^T, *E. cloacae* subsp. *dissolvens* LMG2683^T, *R. solanacearum* LMG 2299^T; 4~9 为 6 株桑“枯萎”代表菌株 ZJUPD1~ZJUPD6(GenBank 登录号 EU430750~EU430755); +, -, w 分别代表阳性、阴性和弱阳性反应

solanacearum 在多种碳源的利用上具有很大差别, 而与 *Enterobacter* 参考菌株除了在 D-蜜二糖、D-棉子糖、D-山梨醇、胸苷等碳源的利用上存在差别外, 其他碳源的利用均相似。此外, 6 株桑“枯萎”菌在 VP 反应和精氨酸双水解酶、鸟氨酸脱羧酶及明胶液化反应与青枯菌 *R. solanacearum* LMG 2299^T 截然不同, 但与 2 株 *Enterobacter* 参考菌株相同, 这进一步表明了 6 株桑“枯萎”菌具有 *Enterobacter* spp. 的特性。

2.3 病原细菌的过敏性反应及致病性

从 22 份桑“枯萎”样本上分离出 120 多个单菌落细菌, 经过敏反应和离体致病性测定获得 36 株桑致病菌株, 从中选出 6 株代表菌株和参考菌株 *E. cancerogenus* LMG2693^T, *E. cloacae* subsp. *dissolvens* LMG2683^T 及 2 株植物青枯病参考菌株 LMG 2299^T 和 ZJUM19981, 将各菌的浓度调节成 10⁸ CFU/mL 的菌悬浮液注射接种非寄主植物烟草叶片, 观察其过敏性反应。结果发现 2 株青枯标准菌株在接种后 24 h 产生明显的过敏性反应, 接种处的水渍状斑转成灰色晕圈; 而 6 株分离菌株和 2 株 *Enterobacter* 参考菌株一样, 在接种后 48 h 产生淡黄色晕圈, 表现为弱过敏性反应。这一结果显示 *Enterobacter* 致病菌在非寄主植物的过敏性反应中与绝大多数已知的植物致病菌有所不同, 并不表现出明显的过敏性反应。该病的田间症状始于桑树叶缘, 叶片由边缘向内卷曲, 似焦状, 枯叶从下到上很快脱落(图 2)。6 株桑“枯萎”代表菌株接种桑幼苗 12~13 天后开始发病, 发病症状与田间相似, 在发病初期似缺水状, 浇水后症状稍有恢复, 但很快又表现凋萎, 一般在凋萎症状出现后 2~3 天开始落叶(图 3)。发病植株在外界气温高于 30℃ 时症状仍有扩展。离体接种后 7~10 天出现病害症状, 表现为叶片发黄、枯萎和枝叶顶端坏死, 大部分离体接种枝条表现发黄褪绿症状后落叶, 最后顶端坏死(图 4)。而用桑青枯菌 *R. solanacearum* ZJUM19981 和 LMG 2299^T 接种桑树幼苗, 发病较缓慢, 病叶表现萎蔫, 但显症叶片不表现落叶。离体接种枝条叶片发黄, 枯萎, 不表现落叶。根据赖文姜等人^[24] 的描述, 桑青枯病田间幼苗感病后叶片失去光泽, 表现为失水凋萎, 老龄桑树感病叶片干枯, 落叶缓慢。

2.4 病原细菌 Biolog 鉴定结果

6 个桑“枯萎”代表菌株的 Biolog 测定结果显示(表 2), 它们均被鉴定为 *Enterobacter* 属, 其中菌株 ZJUPD1~ZJUPD5 与 *E. cloacae* 的相似度在 0.555~0.844; 菌株 ZJUPD6 与 *E. cancerogenus* 的相似度为 0.621。它们与对照参考菌株 *E. cancerogenus* LMG2693^T 和 *E. cloacae* subsp. *dissolvens* LMG2683^T 的相似度相接近。2 株桑青枯参考菌株的 Biolog 结果与原鉴定相一致。

2.5 病原细菌的 FAMEs 鉴定结果

FAMEs 鉴定结果匹配程度遵循 Buyer 等人^[25] 的原则: 相似性系数 < 0.2, 结果不可用; 相似性系数 ≥ 0.5, 鉴定到属。6 个桑“枯萎”菌株在 *Enterobacter* 属水平上的 FAME 鉴定结果与 Biolog 鉴定完全一致(表 3), ZJUPD1~ZJUPD6 均被鉴定为与 *E. cancerogenus*, 但除 ZJUPD6 的 FAMEs 相似度 0.839 超过对照参考菌株 LMG2693^T 外。其他 5 株桑“枯萎”菌的相似度均较低。2 株桑青枯参考菌株的 FAME 结果与原鉴定相一致。

2.6 病原细菌的 ERIC-PCR 分析

ERIC-PCR 技术适宜于 *Enterobacter* spp. 细菌的分型及鉴定上^[18]。本研究的 ERIC-PCR 结果(图 5)利用 TREECON 软件^[26] 进行 ERIC-PCR 条带指纹图谱分析, 6 株桑“枯萎”菌株与 *Enterobacter* 8 种参考菌株的遗传距离矩阵(表 4)显示, 除 ZJUPD1 的带型与参考菌株 *E. agglomerans* LMG2557 相似外, 其他 5 株桑“枯萎”菌株与 7 个 *Enterobacter* 模式种菌株在遗传距离上具有明显的差异, 其中 ZJUPD4 与最相近的 *E. helvetica* 也有 35.29 cM 的遗传距离, 证明了这 6 株桑“枯萎”病代表菌株为一类尚未报道的 *Enterobacter* spp. 植物致病菌。

2.7 病原菌的 16S rRNA 序列的比较分析及系统发育分析

在核糖体 RNA 标准数据库 RDP 下载 *Enterobacter* 不同种的标准 16S rRNA 序列, 利用 BLAST^[27] 程序对 6 株桑“枯萎”菌株 ZJUPD1~6 进行本地检索。根据 Iversen 等人^[16] 对 *Enterobacter* 种的划分标准: 16S rRNA 序列总长在 1300 bp 以上, 且连续匹配相似度在 98.7% 以上的认为是同一种。6 株桑“枯萎”



图 2 田间桑树“枯萎”发病症状

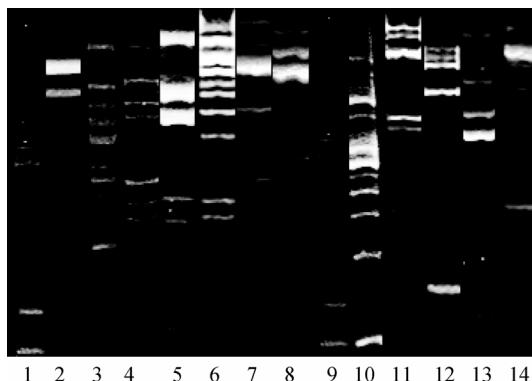
图 3 幼苗接种 *Enterobacter* sp. ZJUPD2 的发病症状
右边为正常对照图 4 桑枝离体接种 *Enterobacter* sp. ZJUPD2 的发病症状
①为接种无菌水对照

表 2 6 株桑“枯萎”致病菌及 3 株参考菌株的 Biolog 相似度

菌株	GenBank 登录号	宿主	原鉴定结果	Biolog 相似度	Biolog 鉴定结果
ZJUPD1	EU430755	桑树	-	0.555	<i>E.cloacae</i>
ZJUPD2	EU430751	桑树	-	0.536	<i>E.cloacae</i>
ZJUPD3	EU430752	桑树	-	0.620	<i>E.cloacae</i>
ZJUPD4	EU430753	桑树	-	0.574	<i>E.cloacae</i>
ZJUPD5	EU430754	桑树	-	0.844	<i>E.cloacae</i>
ZJUPD6	EU430750	桑树	-	0.621	<i>E.cancerogenus</i>
LMG2693 ^T	-	杨树	<i>E. cancerogenus</i>	0.673	<i>E.cancerogenus</i>
LMG2683 ^T	-	玉米	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	0.662	<i>E.cloacae</i>
LMG2299 ^T	-	桑树	<i>R. solanacearum</i>	0.682	<i>R. solanacearum</i>
ZJUM19981	-	桑树	<i>R. solanacearum</i>	0.870	<i>R. solanacearum</i>

表3 6株桑“枯萎”致病菌与3株参考菌株的FAME分析结果

原菌株号	GenBank 登录号	寄主	原鉴定结果	FAME 相似度	FAME 鉴定结果
ZJUPD1	EU430755	桑树	-	0.593	<i>E.cancerogenus</i>
ZJUPD2	EU430751	桑树	-	0.692	<i>E.cancerogenus</i>
ZJUPD3	EU430752	桑树	-	0.644	<i>E.cancerogenus</i>
ZJUPD4	EU430753	桑树	-	0.639	<i>E.cancerogenus</i>
ZJUPD5	EU430754	桑树	-	0.710	<i>E.cancerogenus</i>
ZJUPD6	EU430750	桑树	-	0.839	<i>E.cancerogenus</i>
LMG2693	-	杨树	<i>E. cancerogenus</i>	0.740	<i>E.cancerogenus</i>
LMG2683	-	玉米	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	0.644	<i>E.cloacae</i>
LMG2299	-	桑树	<i>R. solanacearum</i>	0.702	<i>R. solanacearum</i>
ZJUM19981	-	桑树	<i>R. solanacearum</i>	0.700	<i>R. solanacearum</i>

图5 14株 *Enterobacter* 菌的 ERIC-PCR 指纹图谱

1~8 为肠杆菌属中与植物有关的 8 株模式菌株 *E. agglomerans* LMG2557, *E. amnigenus* LMG2784^T, *E. cancerogenus* LMG2693^T, *E. cloacae* subsp. *dissolvens* LMG2683^T, *E. helveticus* LMG23732^T, *E. nimipressuralis* LMG10245^T, *E. pyrinus* LMG22970^T, *E. turicensis* LMG23730^T; 9~14 为桑枯萎病代表菌株 ZJUPD1~ZJUPD6

表4 14株 *Enterobacter* 菌的 ERIC-PCR 遗传距离分析结果^{a)}

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
89.47	64.71	89.47	62.50	36.84	0.00	78.95	89.47	66.67	76.47	72.22	45.18	75.00	0.00
93.33	80.00	76.92	86.67	63.16	75.00	71.43	76.92	94.44	93.33	87.50	70.59	0.00	75.00
87.50	66.67	94.12	73.33	35.29	41.18	66.67	87.50	76.47	87.50	75.00	0.00	70.59	41.18
72.73	85.71	60.00	75.00	80.00	72.22	66.67	60.00	45.46	60.00	0.00	75.00	87.50	72.22
80.00	83.33	80.00	70.00	90.00	76.47	83.33	100.00	50.00	0.00	60.00	87.50	93.33	76.47
75.00	78.57	75.00	54.55	80.95	66.67	78.57	84.62	0.00	50.00	45.46	76.47	94.44	66.67
66.67	83.33	66.67	91.67	90.00	89.47	83.33	0.00	84.66	100.00	60.00	87.50	76.92	89.47
72.73	85.71	83.33	84.62	73.68	78.98	0.00	83.33	78.57	83.33	66.67	66.67	71.43	78.95
89.47	64.71	89.47	62.50	36.84	0.00	78.95	89.47	66.67	76.47	72.22	41.18	75.00	0.00
95.24	66.67	84.21	72.22	0.00	36.84	73.68	90.00	80.95	90.00	80.00	35.29	63.16	36.84
81.82	63.64	91.67	0.00	72.22	62.50	84.62	91.67	54.55	70.00	75.00	73.33	86.67	62.50
80.00	72.73	0.00	91.67	84.21	89.47	83.33	66.67	75.00	80.00	60.00	94.12	76.92	89.47
72.73	0.00	72.73	63.64	66.67	64.71	85.71	83.33	78.57	83.33	85.71	66.67	80.00	64.71
0.00	72.73	80.00	81.82	95.24	89.47	72.73	66.67	75.00	80.00	72.73	87.50	93.33	89.47

a) 1~14 的菌株名与图5相同

病菌的 BLAST 结果显示, 它们与目前 *Enterobacter* 属中 16 个与植物和环境有关种的 16S rRNA 序列匹配度均在 97%~98% 之间, 这表明这 6 株病原菌应该为 *Enterobacter* 属中的新种。系统发育树分析结果(图 6)显示 ZJUPD6 与 *E. asburiae* 聚成一支, ZJUPD1 及 ZJUPD3 与 *E. agglomerans* 聚成一支, ZJUPD2, 4, 5 与 *E. cancerogenus* 聚成一支, 这表明分离到的 6 株致病菌内部之间还存在着一定的差异, 桑“枯萎”病的病原细菌可能涉及到 *Enterobacter* 属内至少 2 个新种。

3 讨论

本文通过对桑树“枯萎”病组织中分离到的 6 株病原细菌经常规细菌学、生理生化、电子显微镜观察、致病性及 Koch 氏假说测定、Biolog 鉴定、脂肪酸分

析、ERIC-PCR 分析、16S rRNA 序列分析等方法测定及与 10 株参考菌株的比较, 确认它们为肠杆菌属植物致病菌。这不仅是 *Enterobacter* spp. 引起植物细菌病害在中国的新记录, 而且在世界上首次分离和证实了 *Enterobacter* spp. 是引起桑树“枯萎”病的病原。根据 Biolog 鉴定和脂肪酸分析, 菌株 ZJUPD6 均被鉴定为 *E. cancerogenus*, 但与来自杨树的 *E. cancerogenus* LMG2693^T 模式菌株相比较, ZJUPD6 在桑树上致病, 而 LMG2693^T 只在杨树上致病, 但在桑树上不致病, 而且其 16S rRNA 序列与 *Enterobacter* 属中 16 个与植物和环境有关种的序列相比较, 与 *E. cancerogenus* 的相似值在 98% 以下。而其他 5 株病原细菌的 Biolog 鉴定、脂肪酸分析、ERIC-PCR 分析和 16S rRNA 序列比较结果表明, 它们又有别于 ZJUPD6 菌。这表明引起桑树“枯萎”病的病原涉及 *Enterobacter* 中一个以上的新种。*Enterobacter* spp. 在植物致病菌中的报道甚

少, 目前只有 *E. cancerogenus*, *E. cloacae* subsp. *dissolvens*, *E. nimipressuralis*, *E. pyrinus* 和 *E. cloacae* 分别引起白杨、玉米、榆树、亚洲梨、坚果病害。结合本次研究, 我们发现 *Enterobacter* 细菌更容易选择木本植物作为其宿主。我们将 *E. cancerogenus* LMG2693^T, *E. cloacae* subsp. *dissolvens* LMG2683^T 2 株参考菌株接种桑苗, 发现其并未产生明显的致病反应(结果未显示), 验证了 Saddler 报道的 *Enterobacter* spp. 的宿主范围非常狭窄^[5,28]。*Enterobacter* spp. 像 *Burkholderia cepacia* 复合菌一样^[29], 它既是人类的敌人又是人类的朋友。作为敌人, 它除了侵害植物, 同时也是人体条件致病菌^[30]; 作为朋友, 它可作为重要的工程菌^[31], 在农业环境中对一些植物的生长起着促进作用, 可作为生物农药^[32], 在有害生物的防治方面起着重要的作用^[33]。本研究通过对 6 株桑“枯萎”病细菌的多种表型和基因型方法的测定明确它们为 *Enterobacter*

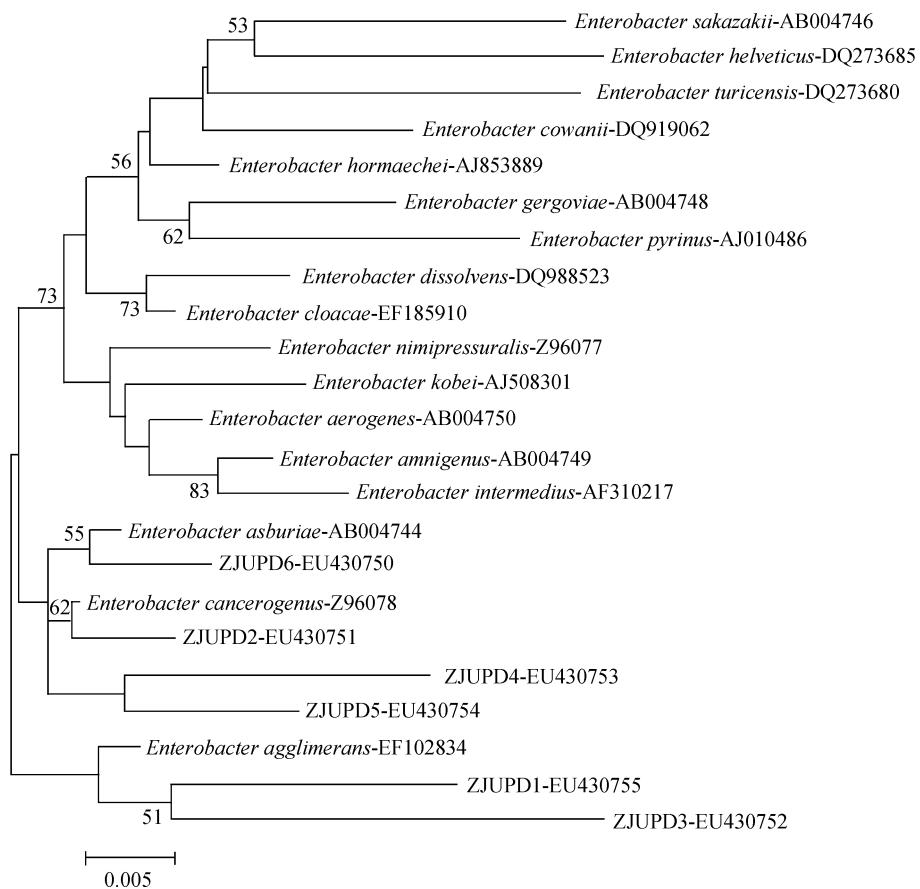


图 6 利用 16S rRNA 由 NJ 法构建的系统发育树

支长代表分歧度, 树上的数字代表 Bootstrap 1000 次的支持率, 支持率低于 50 未显示

spp., 如前所述, *Enterobacter* 属中现报道有 21 种和 2 个亚种, 而绝大多数与动物和环境有关, 我们虽然收集了与植物有关的所有 8 个种并明确了与 6 株桑“枯萎”病菌之间的遗传差异, 但由于无法得到其他种的菌株, 致使桑“枯萎”病原确切种名的决定尚有一定难度。

肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)细菌是目前国内外细菌学研究的热点, 除 *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. 外还包括 *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Shigella* spp. 等动物-病原物互作的模式菌以及 *Erwinia* spp. 等植物-病原物互作菌, 是目前为止测序种类最多的科^[34]。随着基因组测序技术的不断发展以及基因组数据量的不断增多, 目前的研究越来越多的偏向于比较基因组的研究, 特别是那些既是致病菌又能在环境中作为非致病菌而广泛存在的细菌, 越来越受到研究者的关注。然而肠杆菌科大部分细菌宿主较为单一, 如 *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* 等动物致病菌几乎无法在植物上引起病害, 而 *Erwinia* spp. 等植物致病菌无法在动物上引起病害, 这些因素限制了其在比较基因组研究中所能起到的作用。*Enterobacter* spp. 具有的特征可使其成为比较基因组学中优良的材料。*Enterobacter* spp. 基因组数据还很少, 目前全基因组测序完成的只有 *Enterobacter sakazakii* (现改名为 *Cronobacter sakazakii*)^[16]。

sakazakii), ATCC BAA-894 以及 *Enterobacter* sp.638^[16], 而 *Enterobacter* spp. 作为植物致病菌, 其致病机制与证据及毒力基因的克隆是一片空白, 目前我们仅知道 *E. cloacae* 能够通过分泌一些化学物质对宿主植物产生毒害而引起一些树本植物病害。本研究通过 *Enterobacter* spp. 在桑树上的致病性及在烟草上的弱过敏性反应推断, 该类植物致病细菌可能不是通过常见的植物致病系统-三型分泌系统对宿主致病。随着对该类细菌研究的不断深入, 必将对植物细菌的进化、分化以及毒力基因的来源、转移以及其致病机制提供重要的信息。

4 结论

综合 6 株桑“枯萎”分离菌株的常规细菌学、电子显微镜观察、致病性及 Koch 氏假说测定、Biolog 鉴定、脂肪酸分析、生理生化与 4 株参考菌株的比较结果, 确证其为国内外尚未报道的桑树新病原, 具有肠杆菌属(*Enterobacter*)细菌的特征。在 6 株桑“枯萎”分离菌株表型鉴定与致病性测定的基础上, 通过 ERIC-PCR 分析及与 10 株参考菌株的比较、16S rRNA 序列 (GenBank 登录号: EU430750~EU430755) 与 *Enterobacter* 属中 16 个与植物和环境有关种的序列比较表明, 桑“枯萎”病原是由 *Enterobacter* 属 1 个以上的新种所引起。

参考文献

- 1 Ohl M E, Miller S I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med*, 2001, 52: 259—274 [[DOI](#)]
- 2 Perombelon M C M, Kelman A. Ecology of the soft rot *Erwinias*. *Annu Rev Phytopathol*, 1980, 18: 361—387 [[DOI](#)]
- 3 Sanders W E J, Sanders C C. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev*, 1997, 10: 220—241
- 4 Iversen C, Forsythe S J. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci Technol*, 2003, 14: 443—454 [[DOI](#)]
- 5 Saddler G. Bacteria and Plant Disease 10. Plant Pathologist's Pocketbook. Egham: CABI Bioscience, 2002
- 6 Nishijima K A, Wall M M, Siderhurst M S. Demonstrating pathogenicity of *Enterobacter cloacae* on macadamia and identifying associated colatiles of gray kernel of macadamia in Hawaii. *Plant Dis*, 2007, 91: 1221—1228 [[DOI](#)]
- 7 删元璋. 桑病研究的成就与进展. *蚕业科学*, 2000, 26 (s): 9—14
- 8 Martinez H R, Pinckard T R, Costa H S, et al. Discovery and characterization of *Xylella fastidiosa* strains in Southern California causing mulberry leaf Scorch. *Plant Dis*, 2006, 90: 1143—1149 [[DOI](#)]
- 9 Banerjee R, Manas D M, Ghosh P, et al. Genetic analysis of disease resistance against *Xanthomonas campestris* pv. *mori* in mulberry (*Morus* spp.) and identification of germplasm with high resistance. *Arch Phyto Plant Protection*, 2007, 40: 176—182 [[DOI](#)]
- 10 Nishijima K A, Couey H M, Alvarez A M. Internal yellowing, a bacterial disease of papaya fruits caused by *Enterobacter cloacae*. *Plant Dis*, 1987, 71: 1029—34 [[DOI](#)]

- 11 Klement Z, Rudolph K, Sands D C. Methods in Phytopathology. Budapest: Akademiai Kiado, 1990.
- 12 Schaad N W, Jones J B, Chun W. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Minnesota: APS Press, 2001
- 13 徐丽慧, Praphat Kawicha, 谢关林. 桑青枯病致病性测定新方法. 蚕桑通报, 2007, 38 (1): 19—19
- 14 Xie G L, Soad A, Swings J, et al. Diversity of gram negative bacteria antagonistic against major pathogens of rice seed in the tropic environment. J Zhejiang University Sci, 2003, 4: 463—468 [[DOI](#)]
- 15 Hoffmann H, Roggenkamp A. Population genetics of the nomenpecies *Enterobacter cloacae*. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 5306—5318 [[DOI](#)]
- 16 Iversen C, Lehner A, Mullane N, et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genospecies 1. BMC Evol Biol, 2007, 7: 64 [[DOI](#)]
- 17 Cole J R, Chai B, Farris R J, et al. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. Nucleic Acids Res, 2005, 33: D294—D296 [[DOI](#)]
- 18 Fernandez-Baca V F, Ballesteros J A, Hervas P, et al. Molecular epidemiological typing of *Enterobacter cloacae* isolates from a neonatal intensive care unit: three-year prospective study. J Hosp Infect, 2001, 49: 173—182 [[DOI](#)]
- 19 Chenna R, Sugawara H, Koike T. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. Nucl Acids Res, 2003, 31: 3497—3500 [[DOI](#)]
- 20 Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser, 1999, 41: 95—98
- 21 Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol, 2007, 24 (8): 1596—1599 [[DOI](#)]
- 22 Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol, 1987, 4: 406—425
- 23 Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 11030—11035 [[DOI](#)]
- 24 赖文姜, 谭炳安, 陈俊英. 桑青枯病的诊断和青枯菌的分离. 广东蚕业, 1982, 2: 4—5
- 25 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 [[DOI](#)]
- 26 Van de Peer Y, De Wachter R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. Bioinformatics, 1994, 10: 569—570 [[DOI](#)]
- 27 Altschul S F, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool. J Mol Biol, 1990, 215(3): 403—410
- 28 Grimont F, Grimont P A D. The Prokaryotes. New York: Springer, 1992
- 29 Zhang L X, Xie G L. Diversity and distribution of *Burkholderia cepacia* complex in the rhizosphere of rice and maize. FEMS Microbiol Lett, 2007, 266: 231—235 [[DOI](#)]
- 30 French C E, Nicklin S, Bruce N C. Aerobic Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by Pentaerythritol Tetranitrate Reductase. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 2864—2868
- 31 Nie L, Shah S, Rashid A, et al. Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. Plant Physiol Bioch, 2002, 40: 355—361 [[DOI](#)]
- 32 Watanabe K, Abe K, Sato M. Biological control of an insect pest by gut-colonizing *Enterobacter cloacae* transformed with ice nucleation gene. J Appl Microbiol, 2000, 88: 90—97 [[DOI](#)]
- 33 Chernin L, Ismailov Z, Haran S. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(5): 1720—1726
- 34 Tarraga A M C, Bentley S. Animal, vegetable or mineral? Nat Rev Microbiol, 2006, 4: 725—726 [[DOI](#)]