



切花菊花心褐化病原菌分离鉴定及抑菌药剂筛选

胡雅鑫^{1†}, 郭梓婷^{1†}, 方萍², 管志勇¹, 陈素梅¹, 陈发棣¹, 王利凯^{1*}

(1. 南京农业大学园艺学院/作物遗传与种质创新国家重点实验室/农业农村部花卉生物学与种质创新重点实验室, 江苏 南京 210095;
2. 浙江海丰生物科技股份有限公司, 浙江 绍兴 312050)

摘要 切花菊在采后储运过程中面临花心褐化问题, 严重影响了切花的观赏价值和商品价值。由于该问题成批次暴发, 推测为病原菌感染所致。为探究该问题成因并寻找解决方案, 本研究对夏菊‘金扇’花心褐化现象进行了观察分析, 采用科赫(Koch)法则分离鉴定病原菌, 借助全基因组测序分析确定病原菌种类, 并通过平板抑菌试验和鲜切花处理试验筛选鉴定高效抑制剂。结果显示: 花心褐化导致夏菊生产每年损失约10%; 病原菌为高地芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis*), 其最适生长条件为 pH=7.0 和 42 °C。在评价的 15 种常用绿色低毒杀菌药剂中, 80% 乙蒜素为最优杀菌剂, 其 1 000 倍稀释液可显著抑制其他 2 个品种菊花的花心褐化。综上所述, 本研究成功分离鉴定了导致切花菊花心褐化问题的病原菌, 并筛选到绿色、低毒且高效的抑菌药剂, 为防治切花菊采后花心褐化问题提供了理论依据和技术支撑。

关键词 切花菊; 花心褐化; 病原菌分离鉴定; 抑菌药剂筛选; 乙蒜素

中图分类号 S682.11

文献标志码 A

引用格式 胡雅鑫, 郭梓婷, 方萍, 等. 切花菊花心褐化病原菌分离鉴定及抑菌药剂筛选[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2025, 51(1): 137-147. DOI: 10.3785/j.issn.1008-9209.2024.12.023

HU Yaxin, GUO Ziting, FANG Ping, et al. Isolation and identification of pathogenic bacteria causing cut chrysanthemum receptacle browning and screening of antibacterial agents[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 2025, 51(1): 137-147.

Isolation and identification of pathogenic bacteria causing cut chrysanthemum receptacle browning and screening of antibacterial agents

HU Yaxin^{1†}, GUO Ziting^{1†}, FANG Ping², GUAN Zhiyong¹, CHEN Sumei¹, CHEN Fadi¹, WANG Likai^{1*} (1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University/State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/Key Laboratory of Flower Biology and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210095, Jiangsu, China; 2. Zhejiang Haifeng Biotechnology Company, Ltd., Shaoxing 312050, Zhejiang, China)

Abstract Receptacle browning issues arise during the storage and transportation of cut chrysanthemums, leading to a decline in both ornamental and commercial values. Given the recurring nature of this issue in batches, it is hypothesized to be caused by pathogenic bacteria infection. To investigate the causes of this problem and find solutions, we analyzed the receptacle browning phenotype in ‘Jinshan’ summer chrysanthemums, isolated

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32371955); 中央高校基本科研业务费(KJJQ2025009, RENCAI2024015, KJJQ2024011, RENCAI2023007)。

*通信作者(Corresponding author): 王利凯(https://orcid.org/0000-0001-8858-794X), E-mail: wlk@njau.edu.cn

第一作者(First author): 胡雅鑫(https://orcid.org/0009-0000-0415-6748), E-mail: 1722069197@qq.com; 郭梓婷(https://orcid.org/0009-0000-8006-6592), E-mail: 867347042@qq.com。†共同第一作者

收稿日期(Received): 2024-12-02; 接受日期(Accepted): 2025-01-23

and identified the pathogenic bacteria following Koch's postulates, determined the species through whole-genome sequencing analysis, screened high-efficiency inhibitors through agar plate inhibition assays, and validated their efficacy using cut chrysanthemum treatment experiments. The results indicated that receptacle browning led to an annual loss of approximately 10% in summer chrysanthemum production. The identified pathogenic bacterium was *Bacillus altitudinis*, which optimally grew at pH=7.0 and 42 °C. Among the 15 commonly used ecofriendly and low-toxicity antibacterial agents evaluated, 80% ethylcinn emerged as the most effective, with a 1 000-time dilution significantly inhibiting receptacle browning in two other chrysanthemum cultivars. In conclusion, this study successfully isolates and identifies the pathogenic bacteria responsible for receptacle browning in cut chrysanthemums, and screens ecofriendly, low-toxicity, and high-efficiency antibacterial agents, thereby providing a theoretical basis and technical support for addressing receptacle browning issues in cut chrysanthemums.

Keywords cut chrysanthemum; receptacle browning; isolation and identification of pathogenic bacteria; screening of antibacterial agents; ethylcinn

菊花 (*Chrysanthemum morifolium*) 是菊科 (Asteraceae) 菊属 (*Chrysanthemum*) 多年生草本植物, 原产于中国, 具有悠久的栽培历史和丰富的文化内涵^[1-2], 是我国十大传统名花和世界四大切花之一。切花菊色彩丰富、品种繁多, 具有极高的观赏价值, 且兼具药用和食用等价值。随着我国鲜切花产业的迅速发展, 切花菊除满足国内市场需求外, 也大量出口到周边国家和地区, 是我国近几年出口量占比较大的鲜切花。但近年来, 在企业生产中常遇到切花菊花心褐化问题, 导致其储运和瓶插寿命缩短、观赏价值和商品价值降低, 给企业造成巨大经济损失。该问题常出现在夏菊生产中, 且成批次暴发, 推测为病原菌感染所致, 但其具体成因和相关防控手段还不清楚。

较常见的菊花侵染性病害主要分为真菌性病害、细菌性病害和病毒性病害。真菌性病害包括菊花灰霉病、枯萎病、茎腐病、黑斑病、白锈病等; 细菌性病害包括菊花青枯病、细菌性枯萎病等; 病毒性病害包括菊花斑萎病毒病、茎坏死病毒病等^[3]。

高地芽孢杆菌 (*Bacillus altitudinis*) 是一种革兰氏阳性菌, 属于杆状需氧细菌。最早从受紫外线激发的平流层大气样本中分离出该菌^[4]。随着研究的深入, 发现高地芽孢杆菌在环境中广泛存在, 在海洋^[5]、湖水^[6]、土壤^[7]及淤泥^[8]等不同样本中均被检测到。该菌含有 1 条约 3.8 Mb 的染色体和 1 个 32 kb 的质粒 DNA, 编码约 4 000 个基因, 其中蛋白编码基因约 3 800 个^[9-10]。作为植物的内生菌, 高地芽孢杆菌具有促进植物生长发育的作用^[11-13]。在作物生产中, 它还可作为生防菌使用, 能有效增强作物对不同胁迫的抗性, 如增强大豆幼苗对根腐病的抗性^[14]、

提高马铃薯对黑腐病的抗性^[15]、增强棉花对黄萎病的抗性^[16]、缓解重金属铜对小麦的毒害作用^[17]等。然而, 近年来发现, 该菌也会作为有害菌影响作物生产。例如, 在石榴种植中发现其籽粒上出现的黑腐斑点由高地芽孢杆菌感染所致^[18]。也有研究发现, 该菌是苹果和梨果实软腐病的致病菌^[19], 同时也是梨树叶片焦枯的致病菌^[20]。该菌是不是切花菊的致病菌和关于该菌的防治措施还鲜有报道。

现阶段, 化学防治仍是菊花病害防治的常用手段, 主要借助农药抑制或杀灭病原菌, 以减少其数量并延缓传播速度^[21]。然而, 在实际生产中, 经常存在盲目用药和过度用药的问题, 这不但提高了生产成本, 还对环境造成了不利影响^[22]。因此, 明确病害的病原菌种类, 筛选高效低毒的绿色抑菌或杀菌药剂, 对于减少用药盲目性并科学使用农药具有重要意义。现有的化学防治手段多针对菊花真菌性病害, 如对于菊花褐斑病和锈病等病害, 可选用 40% 杜邦福星乳油 600~800 倍液、50% 咪酰胺锰络合物可湿性粉剂 800~1 000 倍液或 10% 苯醚甲环唑水分散粒剂 1 000~1 500 倍液进行叶面喷雾防治^[23]; 对于菊花灰霉病, 则可选用 0.25 g/L 苯醚甲环唑对病株进行喷施, 其防治效果能达到 90% 以上^[24]。然而, 对菊花细菌性病害的防治报道相对较少。

本研究以市售切花菊‘金扇’为研究对象, 针对其常见的心褐化问题进行病原菌的分离鉴定, 并通过全基因组测序确定病原菌的种类; 同时, 对该病原菌的生物学特性进行研究, 以确定其最适生长条件, 并筛选高效的绿色低毒杀菌剂, 为防控该病原菌和解决切花菊花心褐化问题提供新思路和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料:花心褐化夏菊‘金扇’(于2022年10月采自浙江海丰生物科技股份有限公司高山基地);健康切花菊品种‘金扇’‘罗斯安娜粉绿’和‘粉安娜’。

供试培养基:LB(Luria-Bertani)培养基(10 g/L胰蛋白胨、5 g/L酵母提取物、10 g/L氯化钠)。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌分离鉴定

除去感病‘金扇’表面的杂质和泥土,转入超净工作台。从其茎部病健交界处切取直径约5 mm的组织小块,先于75%乙醇溶液中浸泡30 s,再于10%次氯酸钠溶液中浸泡3 min,最后用无菌水冲洗3次。处理后的组织小块用无菌剪刀剪碎,浸到少量无菌水中并静置10 min,以使病原菌溢出。将浸泡后的液体均匀涂布到LB平板培养基上,置于28℃恒温培养箱中培养。待长出菌落后,挑取单菌落,采用划线法接种至新的LB平板培养基上进行菌株纯化培养,得到的纯化菌株于4℃冰箱中保存,备用。

将保存的纯化菌株用划线法在LB平板培养基上进行接种,在28℃恒温培养箱中培养48 h后,挑取菌落,用无菌水制成 1×10^8 CFU/mL的细菌悬液。根据科赫(Koch)法则,用1 mL针管吸取0.2 mL菌悬液注射健康‘金扇’的花心,以接种等体积无菌水作为对照,每组10枝花,3个重复。3 d后观察记录病征相符率,即接种后病征表现是否与原病征相符,以及相符病征枝数占总枝数的比例。

从发病的植株病部重新分离病原菌,比较原始分离菌株与新分离菌株的菌落状态,确定其致病性。

1.2.2 病原菌分子生物学鉴定

利用通用引物(27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';1492R:5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')^[25]对病原菌进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增,反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸30 s,35个循环;最后于72℃延伸5 min,4℃保存。经琼脂糖凝胶电泳后,将回收产物送至南京思普金生物科技有限公司进行测序。将得到的序列在美

国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上进行BLAST分析。

1.2.3 病原菌基因组测序及基因组初步组装

DNA提取:参照文献[26]的方法,将分离的细菌接种到LB培养基中进行大量培养,收集菌体并提取其基因组DNA,然后通过溶菌酶裂解后进行核糖核酸酶(RNase)和蛋白酶K孵育,进而通过酚-氯仿-异戊醇溶液处理和乙醇沉淀,获得高质量的细菌DNA。

建库测序:利用Tn5转座酶对DNA进行随机片段化并建库,之后通过NovaSeq 6000平台进行双端测序(广州安诺科技股份有限公司)。过滤掉测序的原始数据(raw data)中低质量读长数据(read data)和建库接头序列,最终获得高质量读长数据(clean data)。

基因组初步组装:在获得高质量读长数据后,使用Minia v0.0102软件对该细菌基因组进行初步组装。Minia是基于德布莱英图(de Bruijn graph)的基因组片段拼接软件,适用于短序列读长的从头组装^[27]。通过该软件从短读长文库中组装出拼接序列——重叠群(contigs),进而对排名前5的重叠群分别在NCBI进行BLAST分析,最终确定该菌的种属关系。

1.2.4 病原菌生物特性测定

不同温度对病原菌生长的影响:将100 μL在600 nm波长处的吸光度 $[D(600\text{ nm})]$ 为0.4的菌悬液均匀涂布至LB平板培养基上,分别置于16、28、37、42、55℃恒温培养箱中,培养12 h后,观察菌落生长趋势,并用ImageJ软件统计平板灰度值。

不同pH值对病原菌生长的影响:分别用1 mol/L HCl溶液和1 mol/L NaOH溶液将LB培养基的pH值调至3、5、7、9、11、13共6个梯度,将100 μL $D(600\text{ nm})=0.4$ 的菌悬液涂布至不同pH值的LB平板培养基上,在37℃恒温培养箱中培养12 h后统计菌落数,并用ImageJ软件统计平板灰度值。

1.2.5 病原菌抑菌药剂平板筛选

根据已有研究^[28],从市售农药中挑选了15种常用于细菌防治的绿色低毒农药(附表1,<https://www.zjujournals.com/agr/CN/10.3785/j.issn.1008-9209.2024.12.023>)进行药剂毒力测定。

具体操作方法:将待测药剂用无菌水稀释

10 倍、100 倍、1 000 倍后备用。挑取经鉴定为高地芽孢杆菌的单菌落接种于 LB 液体培养基中,置于 28 ℃、220 r/min 的摇床上振荡培养 18 h,然后用无菌水将菌悬液浓度调至 $D(600\text{ nm})=0.8$,备用。用移液枪吸取 100 μL 制备好的菌悬液至 LB 固体培养基上,涂布均匀、吹干后备用。用打孔器在培养基表面均匀打 3 个孔,每个孔滴入 10 μL 相同浓度的药剂(每个平板 3 个重复),以无菌水作为阴性对照。在 28 ℃ 恒温培养箱中培养 1 d 后,用十字交叉法测量抑菌圈直径(2 条直径的平均值)。平均抑菌圈直径=5 mm 表示该药剂无抑菌作用,>5 mm 则表示有抑菌作用^[29]。试验数据使用 Microsoft Excel 2003、SPSS 26.0 软件进行处理。

1.2.6 最优抑菌药剂抑制花心褐化效果验证

选取市面上常见切花菊品种‘罗斯安娜粉绿’和‘粉安娜’作为试验材料,对平板筛选的最优抑菌药剂进行抑菌效果验证。

具体操作方法:将最优抑菌药剂用无菌水分别稀释 1 000 倍和 3 000 倍,在接种病原菌的鲜切花花头上分别进行喷施处理,每枝 5 mL。将药剂处理后的切花菊用清水瓶插,于 28 ℃ 恒温条件下培养 3 d 后,观察记录切花菊花心情况。用 Windows 11 画图

工具计算褐化面积和花托总面积,经 Microsoft Excel 2003 处理后得到褐化百分比。依据褐化范围是否向花瓣蔓延来量化感病程度(褐化向花瓣蔓延记为 1,褐化未向花瓣蔓延记为 0.5),最终得到感病得分。具体公式如下:感病得分=褐化百分比×感病程度×100。

2 结果与分析

2.1 切花菊花心褐化表型分析

调查发现,夏季是切花菊花心褐化问题的高发季节,每年可导致夏菊生产损失约 10%,且呈现出批次暴发的特点,一旦暴发,花心褐化植株可占该批次切花总数的 90% 以上,故推测由病原菌感染所致。观察发现,切花菊‘金扇’花心褐化主要集中在花托上,其中心部位先出现褐化现象,之后蔓延到整个花托,导致花托发黑腐烂呈脓状(图 1)。这种现象也会向花瓣及叶片蔓延,花瓣由基部向顶端逐渐褐化,花茎则腐烂发黑,花头下垂。叶片根据叶位由上到下逐渐变黄枯萎。此外,感病部位有腐烂味道,未见霉状物、粉状物等真菌感染表征,故判断为细菌性病害所致。

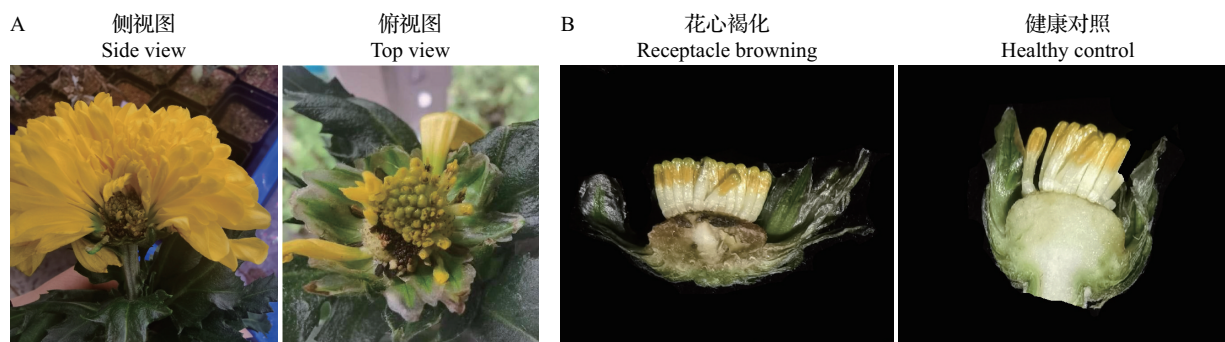


图 1 切花菊‘金扇’花心褐化感病表型

Fig. 1 Receptacle browning phenotypes of the cut chrysanthemum ‘Jinshan’

2.2 切花菊花心褐化病原菌的分离鉴定

从病株中分离出 6 种细菌,分别命名为 1、2、3、4、5 和 6。将它们分别回接到健康的‘金扇’切花上,发现 3 号菌可诱导切花产生花心褐化病征,在 3 次重复试验中出现的概率(特征相符率)分别为 90%、90% 和 100%。1 号和 2 号菌无法诱导切花产生病症,4、5、6 号菌则诱导植株产生不同于花心褐化的发病症状(图 2A~B)。将 3 号菌诱发的花心褐化发病组织接种于 LB 培养基上进一步培养纯化,

得到了与之前 3 号菌株相一致的边缘整齐、平滑有光泽并呈黏液状的乳白色菌落。上述结果说明,3 号菌即为导致切花菊花心褐化的病原菌。

2.3 病原菌种属鉴定

以分离出的 6 种细菌 DNA 作为模板,用通用引物 27F 和 1492R 分别对 6 种细菌的 16S rDNA 进行 PCR 扩增和测序分析,其测序结果见附图 1(<https://www.zjujournals.com/agr/CN/10.3785/j.issn.1008-9209.2024.12.023>)。与 NCBI 数据库中的 DNA 序列

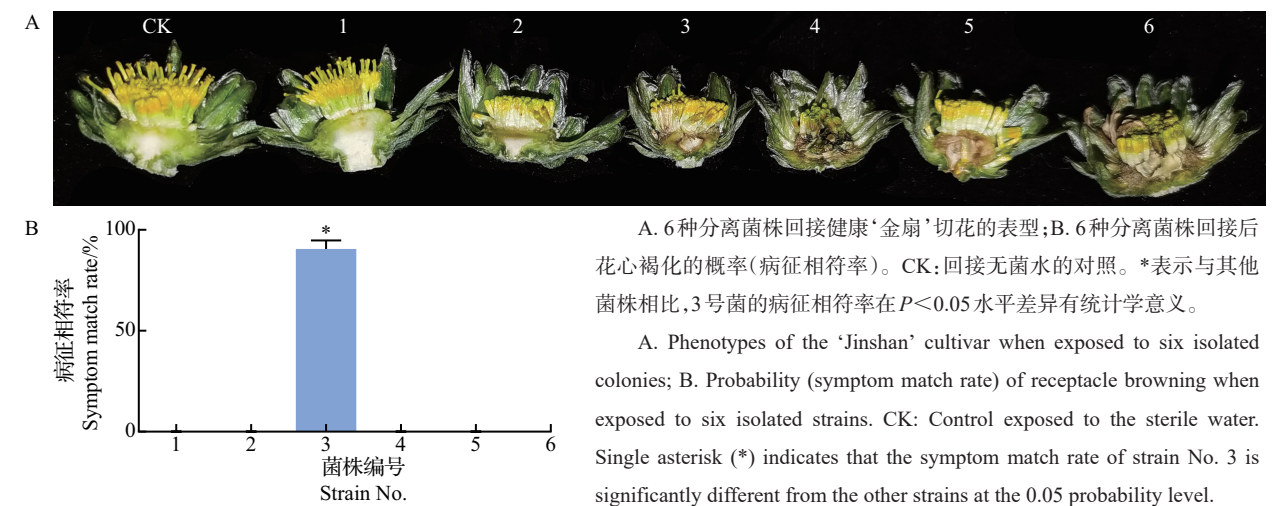


图2 切花菊花心褐化病原菌的分离鉴定

Fig. 2 Isolation and identification of pathogenic bacteria causing receptacle browning in cut chrysanthemums

进行BLAST分析,结果(表1)发现,3号菌的匹配结果为*Bacillus pumilus* 菌株基因组序列。为进一步鉴定3号菌的种类,对其进行全基因组测序,最终获得7 732 777条高质量读长数据(clean data),共计15 465 554 bp的测序碱基数[测序原始数据已经上传到国家生物信息中心组学原始数据归档库(Genome Sequence Archive),项目编号CRA022238, <https://bigd.big.ac.cn/gsa/browse/CRA022238>]。对这些高质量读长数据进行基因组组装,成功获得95个长度大于10 kb的重叠群(图3)。对组装的前5个重叠群在NCBI数据库中分别进行BLAST分析,发现匹配率最高的都是*Bacillus altitudinis* 菌株的基因组序列(表2),且E值(E value)都是0。由于*B. altitudinis*与*B. pumilus*在系统发育上相似,两者16S rDNA基因序列相似度为100%^[30],故最终确定3号菌为高地芽孢杆菌(*B. altitudinis*)。

表1 6种病原菌DNA的PCR产物的BLAST分析结果		
Table 1 BLAST results of the PCR products of DNA from the six isolated bacteria		
菌株编号 Strain No.	DNA鉴定结果 DNA identification result	BLAST参考序列 BLAST reference sequence
1	<i>Bacterium</i> L7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KU221416.1
2	<i>Paenibacillus</i> sp. strain SR266 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	MZ026419.1
3	<i>Bacillus pumilus</i> strain IP10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KY621526.1
4	<i>Bacillus</i> sp. SRI 178 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JQ247010.1
5	<i>Bacillus aryabhattai</i> strain 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KJ009510.1
6	<i>Priestia aryabhattai</i> strain P4-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	OP035945.1

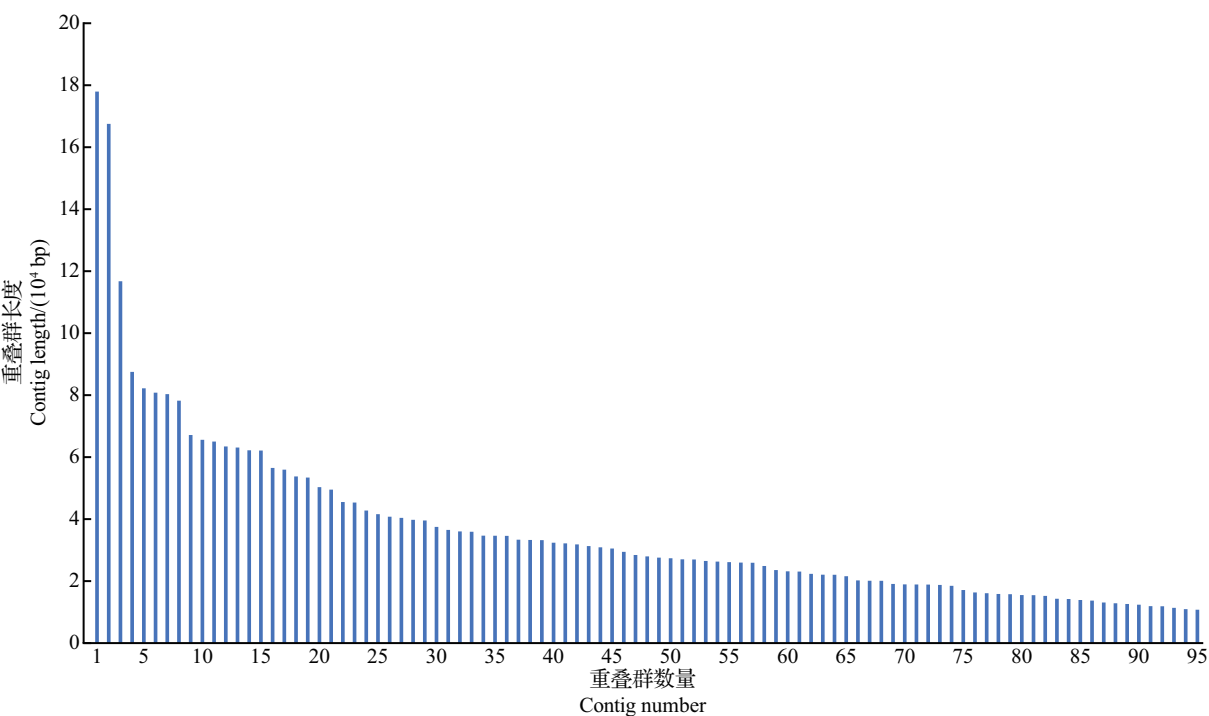
2.4 病原菌的生物学特性

2.4.1 不同温度对病原菌生长的影响

取相同浓度和相同体积的菌液涂布平板进行培养发现:高地芽孢杆菌菌株在28~42℃环境下均可生长,其中在42℃环境下生长最佳;超过55℃或低于16℃时菌落生长均受到显著抑制(图4A)。在42℃时平板灰度值最高(图4B),说明在该温度环境下平板上的菌落生长最快。上述结果说明,高地芽孢杆菌菌株的最适生长温度为42℃,符合夏季高温环境下该病害易发生的特点。

2.4.2 不同pH值对病原菌生长的影响

由于培养基在pH<3.0时不能固化,无法用于观测细菌生长情况,故选择pH值5.0~11.0进行评价。结果(图4C)发现:高地芽孢杆菌菌株在pH<9.0的环境下都能生长,其中在pH=7.0的中性培养基上生长情况最好;在pH=5.0的培养基上,菌落生长稍有抑制;在pH=9.0的培养基上则受到明显抑制;而当pH=11.0时,培养基颜色明显变红,且无菌落生长,故在统计时校正该灰度值为0。统计结果(图4D)也支持了上述结论:菌落在pH=7.0的培养



长度大于 10 kb 的重叠群分布图。
Distribution chart of contigs with the lengths greater than 10 kb.

图3 3号菌的基因组组装结果
Fig. 3 Genome assembly results of strain No. 3

表2 不同重叠群的BLAST分析结果
Table 2 BLAST results for different contigs

序号 No.	重叠群 1 Contig 1	重叠群 2 Contig 2	重叠群 3 Contig 3	重叠群 4 Contig 4	重叠群 5 Contig 5
1	<i>Bacillus altitudinis</i> CES-OCE-19	<i>Bacillus altitudinis</i> 11-1-1	<i>Bacillus altitudinis</i> CHB19	<i>Bacillus altitudinis</i> CES-OCA-19	<i>Bacillus altitudinis</i> VUMS1
2	<i>Bacillus altitudinis</i> P-10	<i>Bacillus altitudinis</i> CHB19	<i>Bacillus</i> sp. FS02	<i>Bacillus altitudinis</i> SCU11	<i>Bacillus altitudinis</i> W3
3	<i>Bacillus altitudinis</i> NC3	<i>Bacillus altitudinis</i> 47	<i>Bacillus altitudinis</i> P-10	<i>Bacillus altitudinis</i> SCU11	<i>Bacillus altitudinis</i> NC3
4	<i>Bacillus altitudinis</i> TM2	<i>Bacillus altitudinis</i> VUMS1	<i>Bacillus altitudinis</i> Cr2-1	<i>Bacillus altitudinis</i> BA06	<i>Bacillus altitudinis</i> HQ-51-Ba
5	<i>Bacillus altitudinis</i> 6ww6	<i>Bacillus altitudinis</i> FD48	<i>Bacillus altitudinis</i> Ba1449	<i>Bacillus altitudinis</i> ABT	<i>Bacillus altitudinis</i> GLB197
6	<i>Bacillus pumilus</i> C4	<i>Bacillus cellulasensis</i> NJ-M2	<i>Bacillus pumilus</i> TUAT1	<i>Bacillus altitudinis</i> 1817	<i>Bacillus altitudinis</i> Ba1449
7	<i>Bacillus altitudinis</i> HM-7	<i>Bacillus cellulasensis</i> NJ-V	<i>Bacillus altitudinis</i> 6ww6	<i>Bacillus altitudinis</i> ws31	<i>Bacillus pumilus</i> TUAT1
8	<i>Bacillus altitudinis</i> VUSM1	<i>Bacillus cellulasensis</i> NJ-V2	<i>Bacillus altitudinis</i> 1943r2a1	<i>Bacillus altitudinis</i> CMF5	<i>Bacillus altitudinis</i> CES-OCA-19
9	<i>Bacillus altitudinis</i> W3	<i>Bacillus altitudinis</i> ws31	<i>Bacillus altitudinis</i> CMF5	<i>Bacillus altitudinis</i> Ba1449	<i>Bacillus altitudinis</i> 1943r2a1
10	<i>Bacillus</i> sp. FS02	<i>Bacillus altitudinis</i> UKM RB11	<i>Bacillus altitudinis</i> SCU11	<i>Bacillus aerophilus</i> KJ82	<i>Bacillus altitudinis</i> ws31

选取前 5 个重叠群进行 BLAST 分析,并列出了前 10 个相似度最高的细菌。
The top 5 contigs were chosen for BLAST analysis, and the table lists the top 10 bacteria with the highest similarity.

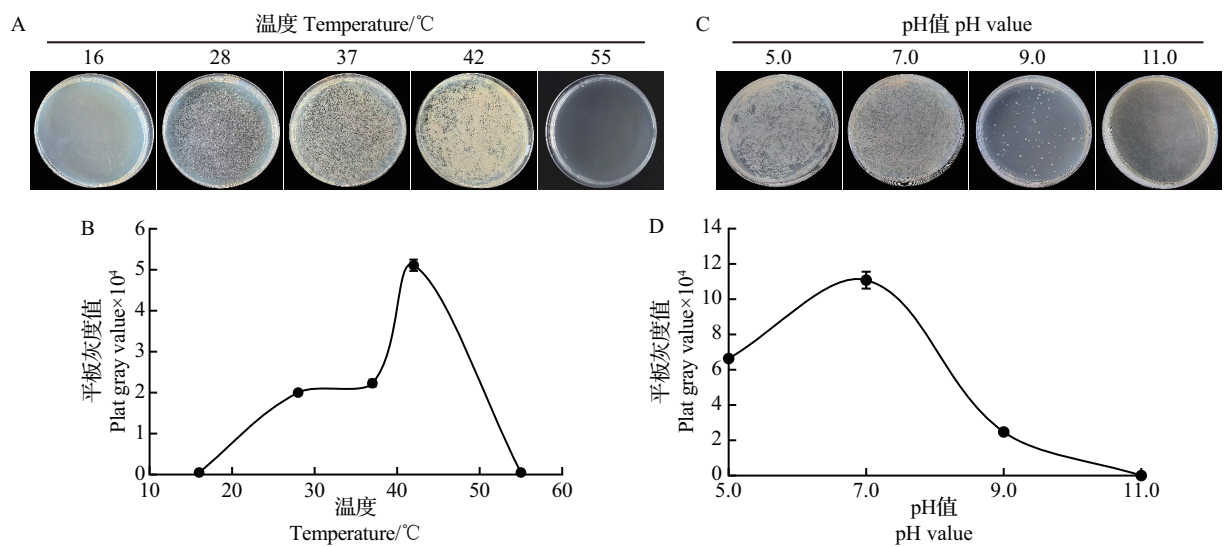


图 4 不同温度和 pH 值对高地芽孢杆菌生长的影响

Fig. 4 Effects of different temperatures and pH values on *B. altitudinis* growth

基上生长最快,在 pH=5.0 的培养基上生长的菌落量是 pH=7.0 培养基上的约 60%,在 pH=9.0 的培养基上生长的菌落量更少,只有 pH=7.0 培养基上的 20%,说明该菌株对环境酸碱性非常敏感,最适宜在中性条件下生长。

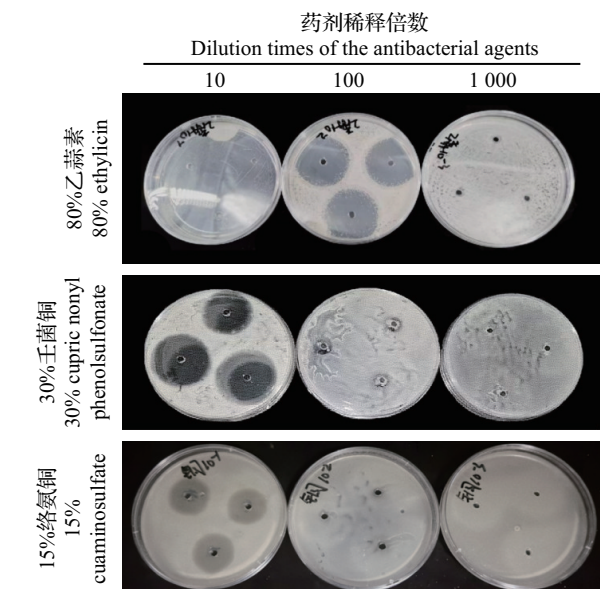
2.5 病原菌抑菌药剂筛选结果

为获得高效且绿色低毒的杀菌剂,选取了 15 种市售常用的抑菌药剂,评价了它们对高地芽孢杆菌的抑制效果。结果(图 5 和表 3)显示:不同药剂对该菌的抑制效果存在明显差异。除了 5% 大蒜素,其他 14 种农药均对该菌具有一定的抑制作用。有 6 种药剂(0.3% 四霉素、33.5% 喹啉铜、27% 春雷·溴菌腈、卡那霉素、80% 乙蒜素、30% 壬菌铜)出现了较大的抑菌圈,其中 80% 乙蒜素的抑菌圈直径最大,透明度高,抑菌效果最好;0.3% 四霉素、27% 春雷·溴菌腈、30% 壬菌铜、卡那霉素的抑菌效果次之;33.5% 喹啉铜随稀释倍数的增加,其抑菌效果迅速降低;40% 苯甲·吡唑酯、1.26% 辛菌胺醋酸盐、15% 络氨铜、45% 咪鲜胺、72% 霜脲·锰锌、10% 溴氰虫酰胺、4% 春雷·中生、40% 百菌清的抑菌效果较差。

以各药剂的稀释倍数(x)和抑菌圈直径(y)构建产生抑菌圈的药剂毒力回归方程,结果如表 3 所示。回归方程中截距大小反映药剂抑菌效力,斜率反映药剂抑菌效力随稀释倍数的削弱程度。综合分析表明,80% 乙蒜素对离体高地芽孢杆菌的抑菌效果最佳。

2.6 最优抑菌药剂抑制花心褐化的效果

将筛选出的最优抑菌剂 80% 乙蒜素在 2 个健康



选取高效(80% 乙蒜素)、有效(30% 壬菌铜)和低效(15% 络氨铜)3 个典型抑菌结果进行展示。抑菌圈越大代表该药剂抑菌效果越显著。

Inhibitory effect images of three typical antibacterial agents with the best (80% ethylcine), good (30% cupric nonyl phenolsulfonate), and low (15% cuaminosulfate). The larger the inhibition zone, the more significant the inhibitory effect of the antibacterial agent.

图 5 不同药剂对高地芽孢杆菌的抑制效果示例

Fig. 5 Representative phenotypes of inhibitory effects of different antibacterial agents against *B. altitudinis*

的切花菊品种‘罗斯安娜粉绿’和‘粉安娜’中进行验证。结果(图 6)发现,80% 乙蒜素在稀释 1 000 倍和 3 000 倍后均能有效遏制由高地芽孢杆菌引起的花心褐化,其中稀释 1 000 倍的抑制效果更强。这些

表 3 14 种药剂对高地芽孢杆菌的抑菌圈测试结果

Table 3 Inhibition zone results of 14 antibacterial agents against *B. altitudinis*

药剂名称 Antibacterial agent	抑菌圈平均直径 Average diameter of inhibition zone/mm			回归方程 Regression equation
	药剂稀释倍数 Dilution times of the antibacterial agents			
	10	100	1 000	
40% 苯甲•吡唑酯 Difenonazole•pyraclostrobin 40% SC	20.54±1.54	13.75±0.66	10.57±0.78	y=17.701—0.007x
80% 乙蒜素 80% ethylicin	48.61±1.47	35.64±0.78	7.57±0.77	y=44.405—0.037x
0.3% 四霉素 0.3% tetramycin	32.76±0.85	27.43±0.48	13.16±1.00	y=31.182—0.018x
卡那霉素 Kanamycin	39.11±1.95	32.99±1.18	22.72±1.20	y=36.961—0.014x
30% 壬菌铜 30% cupric nonyl phenolsulfonate	29.71±2.76	9.32±0.92	3.22±0.32	y=20.983—0.019x
40% 百菌清 40% chlorothalonil	12.42±1.34	7.84±0.72	7.19±0.40	y=10.424—0.003x
45% 咪鲜胺 45% prochloraz	16.16±0.18	15.29±1.47	11.20±0.90	y=15.999—0.005x
72% 霜脲•锰锌 Cymoxanil•mancozeb 72% WP	13.95±1.20	9.81±0.88	9.05±0.91	y=12.154—0.003x
27% 春雷•溴菌腈 27% kasugamycin•bromothalonil	26.28±0.93	21.95±1.40	8.32±1.16	y=25.111—0.017x
4% 春雷•中生 4% kasugamycin•zhongshengmycin	17.07±0.61	9.04±0.39	0	
10% 溴氰虫酰胺 10% cyantraniliprole	13.61±1.81	0	0	
33.5% 喹啉铜 33.5% oxine-copper	20.58±0.95	6.51±1.17	0	
1.26% 辛菌胺醋酸盐 1.26% xinjunan acetate	18.74±1.45	10.28±0.86	0	
15% 络氨铜 15% cuaminosulfate	14.60±0.91	0	0	

y: 抑菌圈直径; x: 药剂稀释倍数。无回归方程代表药剂抑菌效果随稀释倍数削弱过于明显, 致使缺乏统计数据。

y: Diameter of inhibition zone; x: Dilution times of the antibacterial agents. The lack of a regression equation indicates that the inhibitory effect of the antibacterial agent diminishes significantly with dilution, resulting in insufficient statistical data.

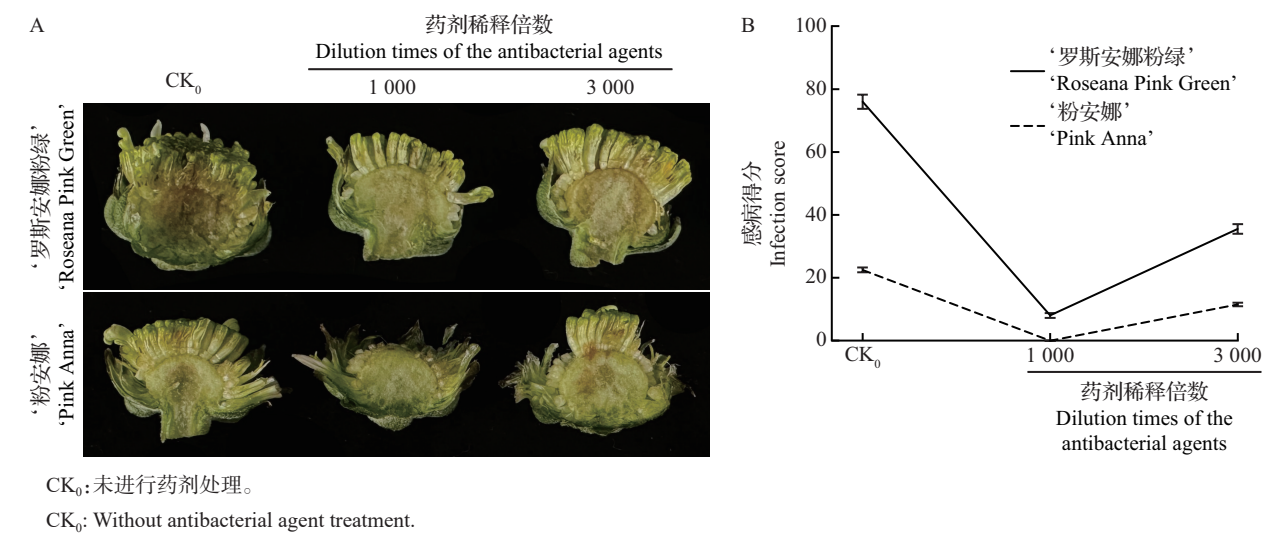


图 6 80% 乙蒜素在切花菊中的抑菌效果验证

Fig. 6 Validation of the antibacterial effect of 80% ethylicin on the cut chrysanthemums

结果说明, 乙蒜素能够有效抑制切花菊花心褐化。

3 讨论

目前, 关于菊花病害的研究主要集中在真菌病害, 而关于细菌性病害的研究相对较少。本研究通

过田间病征分析, 确定了市售切花菊‘金扇’花心褐化现象为细菌感染所致, 进而通过病原菌分离与种属鉴定, 明确了病原菌类别, 并探究了其生物学特性, 为精准防治切花菊花心褐化问题奠定了理论基础。

乙蒜素是我国在 1958 年合成大蒜素及其类似

物时被发现的一种植物仿生农药,具有广谱杀菌作用。乙蒜素能有效抑制多种真菌性病害,如小麦根腐病[禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、刺腐霉(*Pythium spinosum*)、根腐离蠕孢菌(*Bipolaris sorokiniana*)]^[31]和稻瘟病[稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)]^[32]等。乙蒜素还可用于防治马铃薯晚疫病,其机制在于抑制该病原菌核糖体功能和氨基酸代谢,从而抑制蛋白质的合成,影响菌丝生长、孢子产量、孢子萌发和毒力^[33]。作为土壤熏蒸剂,乙蒜素可降低土壤镰刀菌属(*Fusarium*)和疫霉属(*Phytophthora*)微生物的丰度,同时减少植物寄生线虫的丰度,并提高土壤中铵态氮浓度,降低硝态氮浓度和土壤脲酶活性,最终显著促进和提高番茄生长和产量^[34]。除了对真菌性病害的防治作用,乙蒜素也常用于防治细菌性病害。如乙蒜素能有效抑制由白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)引起的细菌性枯叶病,主要通过增加水稻中的防御酶和叶绿素含量来抑制该病原菌增殖^[35]。同样,乙蒜素也能有效防治由丁香假单胞菌猕猴桃致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)感染引起的猕猴桃细菌性溃疡病,主要通过限制该病原菌的迁移、破坏该菌的细胞膜并抑制生物膜的形成来抑制该病原菌增殖^[36]。本研究发现,乙蒜素同样能够抑制感病菊花中高地芽孢杆菌的增殖,有效延缓花心褐化,但其具体作用机制还不清楚,有待进一步研究。

在生产中,化学防治是控制作物病害的主要手段。然而,常用的化学药剂多为人工合成,毒性较大,且易在环境中残留,并导致病原菌产生抗药性,造成环境污染和人体健康危害^[37]。尽管如此,化学农药也具有见效快、使用方便等优点。相比之下,生物农药,即天然存在或生物合成的化合物,具有无毒、不污染环境及不易产生抗药性等特点,因此被称为绿色农药^[38]。但生物农药常存在见效较慢、作用时间短和应用范围窄等不足。鉴于化学农药和生物农药各有优劣,二者混合使用可达到协同增效的效果。例如,生物农药金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)CQMa421与减量化学农药联用,能有效防控玉米田间草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*),在减少化学农药50%用量的情况下,仍保持良好的速效性和持效性,具有推广应用价值^[39]。在百合种球贮藏期腐烂病的防治中,生物农药和化学农药混配剂也表现出优于单一药剂的效果^[40]。针对切花菊

花心褐化问题,本研究发现生物农药乙蒜素是一种有效防治药剂,将来可进一步筛选高效化学农药,并与乙蒜素复配,以期获得更佳的防治效果。

4 结论

本研究基于科赫法则,对出现花心褐化症状的‘金扇’切花菊进行了病原菌分离鉴定,并进行了基因组测序及组装,确定了该病原菌为高地芽孢杆菌(*B. altitudinis*)。通过设置不同温度和pH梯度,发现42℃和pH=7.0的环境最适宜该菌生长,因此,控制栽培和采后环境的温度和pH值可防控该病害。此外,还筛选到针对该病原菌的绿色低毒且高效的抑制药剂乙蒜素,并在其他品种切花菊中验证了其抑菌效果,为切花菊采后花心褐化问题的防治提供了技术支撑。

参考文献(References):

- [1] 戴思兰. 中国菊花的魅力[J]. 中国园林, 2012, 28(8): 46-48.
DAI S L. The fascinations of Chinese chrysanthemum[J]. *Chinese Landscape Architecture*, 2012, 28(8): 46-48. (in Chinese with English abstract)
- [2] 王子凡. 菊花别名映射的菊文化内涵[M]//旅游学研究(第3辑). 南京: 东南大学出版社, 2008: 133-135.
WANG Z F. Chrysanthemum alias mapping the chrysanthemum culture connotation[M]//*Tourism Studies*. Vol. 3. Nanjing: Southeast University Press, 2008: 133-135. (in Chinese)
- [3] 叶琪明, 郭方其, 吴超, 等. 浙江省菊花病害种类及危害特征与分布调查[J]. 江西农业学报, 2019, 31(3): 82-86. DOI: 10.19386/j.cnki.jxnyxb.2019.03.15
YE Q M, GUO F Q, WU C, et al. Survey on kinds, harm characteristics and distribution of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) diseases in Zhejiang[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2019, 31(3): 82-86. (in Chinese with English abstract)
- [4] SHIVAJI S, CHATURVEDI P, SURESH K, et al. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(7): 1465-1473. DOI: 10.1099/ijs.0.64029-0
- [5] HALDER U, BANERJEE A, CHAUDHRY V, et al. Draft genome report of *Bacillus altitudinis* SORB11, isolated from the Indian sector of the Southern Ocean[J]. *Genome Announcements*, 2017, 5(23): e00339-17. DOI: 10.1128/genomeA.00339-17
- [6] SHAFI S, KAMILI A N, SHAH M A, et al. Dynamics of bacterial class *Bacilli* in the deepest valley lake of Kashmir-

- the Manasbal Lake[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 104: 78–83. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.01.018
- [7] VIJAY KUMAR E, SRIJANA M, KIRAN KUMAR K, et al. A novel serine alkaline protease from *Bacillus altitudinis* GVC11 and its application as a dehairing agent[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2011, 34(4): 403–409. DOI: 10.1007/s00449-010-0483-x
- [8] MAO S R, LU Z X, ZHANG C, et al. Purification, characterization, and heterologous expression of a thermostable β -1, 3-1, 4-glucanase from *Bacillus altitudinis* YC-9[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169(3): 960–975. DOI: 10.1007/s12010-012-0064-3
- [9] VETTATH V K, JUNQUEIRA A C M, UCHIDA A, et al. Complete genome sequence of *Bacillus altitudinis* type strain SGAir0031 isolated from tropical air collected in Singapore [J]. *Genome Announcements*, 2017, 5(45): e01260–17. DOI: 10.1128/genomeA.01260-17
- [10] ZENG Q C, XIE J B, LI Y, et al. Comprehensive genomic analysis of the endophytic *Bacillus altitudinis* strain GLB197, a potential biocontrol agent of grape downy mildew[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 729603. DOI: 10.3389/fgen.2021.729603
- [11] ZHANG D N, XU H L, GAO J Y, et al. Endophytic *Bacillus altitudinis* strain uses different novelty molecular pathways to enhance plant growth[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 692313. DOI: 10.3389/fmicb.2021.692313
- [12] CRESPO-PIAZUELO D, GARDINER G E, RANJITKAR S, et al. Maternal supplementation with *Bacillus altitudinis* spores improves porcine offspring growth performance and carcass weight[J]. *British Journal of Nutrition*, 2022, 127(3): 403–420. DOI: 10.1017/S0007114521001203
- [13] RATTIGAN R, LAWLOR P G, CORMICAN P, et al. Maternal and/or post-weaning supplementation with *Bacillus altitudinis* spores modulates the microbial composition of colostrum, digesta and faeces in pigs[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 8900. DOI: 10.1038/s41598-023-33175-2
- [14] WU P H, CHANG H X. Colonization compatibility with *Bacillus altitudinis* confers soybean seed rot resistance[J]. *The ISME Journal*, 2024, 18(1): wrae142. DOI: 10.1093/ismejo/wrae142
- [15] ZHANG Y J, CAO X Y, CHEN Y J, et al. Potential utility of endophytic *Bacillus altitudinis* strain P32-3 as a biocontrol agent for the postharvest prevention of sweet potato black rot [J]. *Biological Control*, 2023, 186: 105350. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2023.105350
- [16] SHAN Y J, WANG D, ZHAO F H, et al. Insights into the biocontrol and plant growth promotion functions of *Bacillus altitudinis* strain KRS010 against *Verticillium dahliae*[J]. *BMC Biology*, 2024, 22: 116. DOI: 10.1186/s12915-024-01913-1
- [17] YUE Z H, CHEN Y J, CHEN C, et al. Endophytic *Bacillus altitudinis* WR10 alleviates Cu toxicity in wheat by augmenting reactive oxygen species scavenging and phenylpropanoid biosynthesis[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 405: 124272. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124272
- [18] LIU Q L, LI D X, HU H Y, et al. First report of *Bacillus altitudinis* causing seed rot of pomegranate in China[J]. *Australasian Plant Pathology*, 2021, 50(4): 427–429. DOI: 10.1007/s13313-021-00789-x
- [19] ELBANNA K, ELNAGGAR S, BAKEER A. Characterization of *Bacillus altitudinis* as a new causative agent of bacterial soft rot[J]. *Journal of Phytopathology*, 2014, 162(11/12): 712–722. DOI: 10.1111/jph.12250
- [20] LEMJIBER N, NAAMANI K, MERIEAU A, et al. Identification and genomic characterization of pathogenic *Bacillus altitudinis* from common pear trees in Morocco[J]. *Agronomy*, 2021, 11(7): 1344. DOI: 10.3390/agronomy11071344
- [21] 李翔宇. 鲁北地区林业有害生物防治[J]. 农业灾害研究, 2024, 14(6): 52–54. DOI: 10.3969/j.issn.2095-3305.2024.06.018
- LI X Y. Forestry pest control in northern Shandong Province [J]. *Journal of Agricultural Catastrophology*, 2024, 14(6): 52–54. (in Chinese)
- [22] 詹庆玲, 屠涵舒, 王梦琪, 等. ‘滁菊’叶部病害病原菌鉴定与化学防治[J]. 南京农业大学学报, 2024, 47(3): 443–452. DOI: 10.7685/jnau.202304012
- ZHAN Q L, TU H S, WANG M Q, et al. Identification and chemical control of leaf disease pathogens in *Chrysanthemum morifolium* ‘Chuju’[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2024, 47(3): 443–452. (in Chinese with English abstract)
- [23] 刘轩武. 滁菊主要病害的发生特点及综合防治措施[J]. 现代农业科技, 2013(24): 151–152. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5739.2013.24.092
- LIU X W. The occurrence characteristics and comprehensive control measures of the main diseases of *Chrysanthemum morifolium* ‘Chuju’[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2013(24): 151–152. (in Chinese)
- [24] 陈方涛. 切花菊灰霉病抗性评价体系建立及防治技术初探 [D]. 南京: 南京农业大学, 2021.
- CHEN F T. Establishment of an evaluation system of cut chrysanthemum gray mold resistance and prevention technology[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2021. (in Chinese with English abstract)
- [25] 臧威, 崔崇士, 张耀伟. 大白菜软腐病苗期抗性鉴定方法的研究[J]. 北方园艺, 2003(3): 57–58. DOI: 10.3969/j.issn.1001-0009.2003.03.041
- ZANG W, CUI C S, ZHANG Y W. Research on the identification method of resistance to soft rot disease in Chinese cabbage during the seedling stage[J]. *Northern Horticulture*, 2003(3): 57–58. (in Chinese)
- [26] KILEDAL A, MARESCA J A. Chromosomal DNA extraction from Gram-positive bacteria, V3V.3[EB/OL]. (2023-07-10) [2024-12-02]. <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.5jyl8511912w/v3>
- [27] CHIKHI R, RIZK G. Space-efficient and exact de Bruijn graph representation based on a Bloom filter[J]. *Algorithms for Molecular Biology*, 2013, 8(1): 22. DOI: 10.1186/1748-

- 7188-8-22
- [28] 王钊. 安祖花细菌性枯萎病病原菌的分子检测与药剂室内筛选[D]. 北京:中国农业科学院,2013.
- WANG Z. Molecular detection of *Xanthomonas asonopodis* pv. *dieffenbachiae* in *Authurium andreaeanum* and laboratory screening of bactericides[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013. (in Chinese with English abstract)
- [29] 唐思琪. 种子处理防治西瓜细菌性果斑病的研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2021.
- TANG S Q. Study on the control of watermelon bacterial fruit blotch by seed treatment[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2021. (in Chinese with English abstract)
- [30] HUDSON L K, ORELLANA L A G, BRYAN D W, et al. Phylogeny of the *Bacillus altitudinis* complex and characterization of a newly isolated strain with antilisterial activity [J]. *Journal of Food Protection*, 2021, 84(8): 1321-1332. DOI: 10.4315/JFP-20-498
- [31] 张博,刘苹,张悦丽,等. 几种生物制剂对小麦根腐病菌的毒力[J]. 麦类作物学报,2018,38(3):366-371. DOI:10.7606/j.issn.1009-1041.2018.03.15
- ZHANG B, LIU P, ZHANG Y L, et al. Toxicity of several biological agents to wheat root rot[J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2018, 38(3): 366-371. (in Chinese with English abstract)
- [32] 陈宇飞,杨明秀,宋爽,等. 18种杀菌剂对黑龙江省稻瘟病菌的室内毒力测定[J]. 黑龙江农业科学,2019(5):56-59. DOI: 10.11942/j.issn1002-2767.2019.05.0056
- CHEN Y F, YANG M X, SONG S, et al. Toxicity measurement of 18 kinds of fungicides on *Magnaporthe grisea*[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2019(5): 56-59. (in Chinese with English abstract)
- [33] ZHANG S M, ZHANG M Q, KHALID A R, et al. Ethylclicin prevents potato late blight by disrupting protein biosynthesis of *Phytophthora infestans*[J]. *Pathogens*, 2020, 9(4): 299. DOI: 10.3390/pathogens9040299
- [34] LI W J, REN L R, LI Q J, et al. Evaluation of ethylclicin as a potential soil fumigant in commercial tomato production in China[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 854: 158520. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.158520
- [35] LU H X, SHEN Z J, XU Y J, et al. Immune mechanism of ethylclicin-induced resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(1): 288-299. DOI: 10.1021/acs.jafc.2c07385
- [36] LIU T, REN X L, CAO G Y, et al. Transcriptome analysis on the mechanism of ethylclicin inhibiting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(4): 724. DOI: 10.3390/microorganisms9040724
- [37] 刘中才,于泳. 正确看待果园中生物农药和化学农药的应用[J]. 果树实用技术与信息,2011(5):38-39.
- LIU Z C, YU Y. The correct view of the application of biological pesticides and chemical pesticides in the orchards [J]. *Guoshu Shiyong Jishu Yu Xinxi*, 2011(5): 38-39. (in Chinese)
- [38] KUMAR J, RAMLAL A, MALLICK D, et al. An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance[J]. *Plants*, 2021, 10(6): 1185. DOI: 10.3390/plants10061185
- [39] 张国彦,郝瑞,徐永伟,等. 生物农药与减量化学农药联用对草地贪夜蛾的防控效果[J]. 中国植保导刊,2024,44(1): 87-89.
- ZHANG G Y, HAO R, XU Y W, et al. Prevention and control effects of biological pesticide and reduced chemical pesticide combinations against *Spodoptera frugiperda*[J]. *China Plant Protection*, 2024, 44(1): 87-89. (in Chinese)
- [40] 马鹏东,梁巧兰,魏列新,等. 几种农药及混配剂对百合种球贮藏期腐烂病的防治效果及对百合的安全性[J]. 植物保护,2024,50(6):321-328. DOI:10.16688/j.zwbh.2023631
- MA P D, LIANG Q L, WEI L X, et al. Control efficacies of several fungicides and mixed agents on lily bulb rot during storage period and their safety to lily[J]. *Plant Protection*, 2024, 50(6): 321-328. (in Chinese with English abstract)