

欧美杨新型溃疡病病株与健株干部树皮中 真、细菌优势种群分析

李永^{1,2}, 朴春根², 贺伟^{1*}, 郭利民³, 常聚普³,
谢守江³, 郭民伟², 林乐民⁴

(1. 北京林业大学,北京 100083; 2. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所,北京 100091;
3. 濮阳市林科所,河南 濮阳 457000; 4. 中国林业科学研究院林业研究所,北京 100091)

摘要:为探讨感染欧美杨新型溃疡病的中林46杨植株干部病斑中真、细菌优势种类,本研究对河南省濮阳市中林46杨健株、病株染病组织的可培养真菌、细菌优势种群进行了分析。结果表明:健康树皮样品分离真菌优势种群均为 *Alternaria alternata*,染病株样品优势种群均为 *Fusarium solani*,而且其菌株数量占所分离菌株总数的百分比均在85%以上;而在健康株3个处理中分离的细菌优势种群种类不同,仅 *Microbacterium* 在健株3个处理树皮样品中均有分布,但染病株3个处理树皮样品中的细菌优势种群均为 *Lonsdalea quercina*,其菌株数量占所分离菌株总数的百分比均在67%以上。以上结果表明:中林46杨发病以后,*F. solani*和*L. quercina*分别变成了真菌和细菌的优势种群。

关键词:欧美杨;溃疡病;16S rRNA;优势种群

中图分类号:S718.8 文献标识码:A

Analysis on Dominant Population of Fungus and Bacteria from Healthy and Canker Disease-Infected *Populus × euroamericana* Bark

LI Yong^{1,2}, PIAO Chun-gen², HE Wei¹, GUO Li-min³, CHANG Ju-pu³, XIE Shou-jiang³,
GUO Min-wei², LIN Le-min⁴

(1. Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 3. Puyang Forestry Institute, Puyang 457000, He'nan, China;
4. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: To explore species changes of dominant population of fungi and bacteria from healthy and canker disease-infected *Populus × euroamericana*, the cultivable bacteria and fungi from healthy and diseased poplar bark in Puyang city were isolated. The results show that the dominant species of fungi from healthy and diseased poplar bark are *Alternaria alternata* and *Fusarium solani* respectively, and the strains number of *F. solani* from diseased poplar bark are more than 85% of all the fungal isolates. And the bacterial dominant species of diseased poplar plants bark is *Lonsdalea quercina*, and the strains number of which are more than 67% of the all bacterial isolates, while the preponderant species of three healthy poplar bark samples are different. *F. solani* and *L. quercina* became the preponderant species in cankers of *Populus × euroamericana*.

Key words: *Populus × euroamericana*; canker disease; 16S rRNA; dominant population

收稿日期:2012-03-01

基金项目:林业公益性行业科研专项(201104054);中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所院所基金(CAFRIFEEP201102-4)

作者简介:李永(1978—),男,山东泰安人,助研,主要从事林木病害及菌种保藏。

* 通讯作者。

我国天然林资源保护工程实施后,为解决我国木材原材料的短缺现状,2002年7月国务院批准速生丰产用材林基地建设工程为六大林业重点工程之一正式实施。目前,我国杨树人工林总面积已达700多万 hm^2 ,超过了其他国家杨树人工林面积的总和,因此,杨树人工林保护对我国经济建设和生态环境保护具有重要意义。

欧美杨(*Populus × euramericana* (Dode) Guinier)溃疡病是我国欧美杨(特别是中林46和107)上新发生的病害,2005年5月,在河南濮阳首次观察到在6年生107杨树伤流溃疡病,主要症状为树皮开裂、流汁液、韧皮部局部坏死等症状。目前,该病害已在我国河南、山东、天津三省市部分地区大面积发生和危害,对我国杨树人工林造成了重大威胁。据菏泽市林业局统计,2007年菏泽市有3万 hm^2 杨树发生该病害。2009年,贺伟等^[1]研究发现,在欧美杨溃疡病病斑分离物中,镰刀菌属(*Fusarium* link.)真菌占优势,以离体枝条水培接种和盆栽苗木活体接种的方法进行的致病性试验表明,茄镰孢菌(*Fusarium solani* (Mart.) Sacc.)具有致病性,认为我国欧美杨溃疡病的病原菌为茄镰孢(*F. solani*),但未开展田间试验。本研究对欧美杨中林46病树病斑和无症树树皮样品的可培养真菌、细菌进行了分离和鉴定及优势种群分析,研究结果将为欧美杨溃疡病病害发展过程中微生物动态变化以及病害发展过程中真菌、细菌协同致病互作研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 样品的采集

样品采集地点位于河南省濮阳市清丰县杨树人工林(115°05'E,35°53'N)。2009年8月,选择症状典型的病株及周围无症树(树龄5~6a)随机3点采样,每点采集染病株3株,采集发病部位距地面1~1.5m病树病斑树皮作为染病样品,长为10~12cm×5~6cm。健康样品采集部位和方式与发病树相同(高度相同胸径部位),用无菌袋包装,采集的样品置于4℃保藏,并尽快进行真菌和细菌的分离。

1.2 真菌的分离培养及计数

染病和健康样品各9个,每个样品切取大小为0.5~0.6cm×1~1.2cm(样品厚度约0.3~0.4cm)的长方形组织块作为分离样品(共9个组织块,

3个样品混合后作为1个处理,设3个处理),然后用自来水冲洗树皮,4%次氯酸钠消毒4min(超净工作台操作中),灭菌水冲洗3次(45s),然后放入灭菌研钵中用无菌手术刀片切成2mm×2mm小组织块(60个组织块/处理),每个处理随机选取40个小组织块放置于马丁氏—孟加拉红培养基平板中(4个组织块/皿,共10皿),染病和健康样品分别培养30皿,28℃培养5~7d计数。计数根据菌落形态颜色等特征进行初步归类,统计每处理(40个组织块上)各种菌长出数量,取3个重复菌株数量的平均数作为菌株数量。

1.3 细菌的分离培养及计数

细菌分离方法参照牟新涛等^[2-3]、陈华红等^[4]的方法并作了部分修改,分别称取健康和染病组织各1.0g(长方形,大小为0.5~0.6cm×1~1.2cm),3个组织块混合后作为1个处理(3g),设3个处理,用自来水冲洗后,放入4%次氯酸钠中消毒4min(超净工作台操作中),灭菌水冲洗3次(45s·次⁻¹),然后放入灭菌研钵中用无菌手术刀片切成2mm×2mm小组织块,加入适量灭菌石英砂研细,将研磨的组织及液体倒入27mL无菌水的三角瓶中,摇床振荡30min作为稀释用样液。健康样品以 10^{-1} ~ 10^{-3} 稀释用样液100 μL 涂板,染病组织以稀释度 10^{-3} ~ 10^{-5} 的稀释液100 μL 涂板,细菌采用牛肉膏蛋白胨培养基涂板培养(每个稀释度,涂3皿,每个处理9皿,3个处理共计27皿),30℃倒置培养2d后计数及纯化培养。

细菌计数,根据菌落形态、大小、颜色等分辨菌种种类,然后统计每个平板菌株数量,取3个重复菌株数量的平均数作为菌株数量,菌种数量比例是指该菌种数量占平板总菌株数量的百分比。

1.4 DNA 提取

1.4.1 细菌 DNA 提取 参照王彦芹等^[5]细菌基因组 DNA 的提取方法并做了部分修改,取2mL过夜培养的菌悬液,10000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心3min,弃上清;加200 μL TE Buffer (10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, pH值8.0),涡旋振荡使细胞充分分散,加200 μL 提取缓冲液(2% (m/v) CTAB, 0.7 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, pH值7.5)、200 μL 3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl,混匀;液氮和100℃环境反复冻融2次;加等体积氯仿:异戊醇(24:1),混匀,4℃6000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心10min抽提2次;取上清,加1/10体积的NaAc(3 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH值5.2),加2倍体积-20℃预冷的无水

乙醇,4 ℃ 12 000 r · min⁻¹离心 15 min;弃上清,风干沉淀,加 100 μL ddH₂O 溶解沉淀,-20 ℃ 冻存备用。

1.4.2 真菌 DNA 提取 采用液氮/沸水反复冻融方法提取^[6],从培养 3~5 d 的菌落边缘取 3 mm × 3 mm 的菌丝块转入 200 μL DNA 提取液体中,经液氮/沸水反复冻融 3 次,然后利用乙醇沉淀 DNA,置 -20 ℃ 保存备用。

1.5 PCR 扩增与序列测定

16S rDNA 扩增引物为细菌通用引物 27f/1492r,扩增条件及体系详见文献^[7]。ITS 扩增应用真菌通用引物 ITS1/ITS4,引物序列及扩增程序详见文献^[8]。PCR 扩增产物直接送北京博迈德科技发展有限公司,经公司切胶纯化后用 37 30XL DNA 测序仪测序。

1.6 菌种鉴定

1.6.1 细菌鉴定 利用网络鉴定工具 EzTaxon Server version 2.1 对分离细菌菌株进行种类鉴定(<http://147.47.212.35:8080/>),以 16S rRNA 基因序列数据比对结果为细菌鉴定依据,16S rRNA 基因序列与模式菌种的相似性大于 97%,即视为与该模式菌种同种,小于 97% 视为不同种^[9]。

1.6.2 真菌鉴定 用形态特征和 ITS 序列分析相结合的方法,根据真菌的菌丝、有性或无性孢子、产孢结构等形态特征,参照《真菌鉴定手册》^[10] 鉴定到属;然后分别利用 NCBI Blast 工具和 EMBL Fasta 工具进行序列分析比对,验证形态特征鉴定结果的可靠性,菌株 ITS 序列与参比序列相似性大于 97% 视

为相同的种,而相似性在 95%~96.9% 视为相同的属^[11]。

2 结果与分析

2.1 菌种分离

本研究根据真菌、细菌菌落形态、颜色等特征对每个处理培养的真菌、细菌不同种类进行了分离和纯化。本研究分离纯化细菌菌株 94 株,其中,染病株 3 个处理分离细菌菌株 46 株,处理 I、II、III 分离细菌菌株数量分别为 16、13、17 株;3 个健康株 3 个处理分离细菌菌株 48 株,处理 I、II、III 分离细菌菌株数量分别为 19、15、14 株。分离纯化真菌菌株 66 株,其中,染病株 3 个处理分离真菌菌株 24 株,处理 I、II、III 分离真菌菌株数量分别为 8、9、7 株;3 个健康株样品分离真菌菌株 42 株,处理 I、II、III 分离真菌菌株分别为 13、17、12 株。

2.2 真菌优势种群及种类异同

健康株 3 个处理(9 个树皮样品)分离的真菌优势种群均为链格孢(*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.),其菌株数量分别占所分离菌株总数的 42.8%、40.0%、37.5%,但非优势种群的真菌种类及其数量并不相同,仅 *F. solani* 在 3 个健康株树皮上均有分布。染病株的真菌种类较为单一,仅有 1~2 种,9 个病株 3 个重复(9 个样品)的真菌优势种群均为 *F. solani*,而且其菌株数量均占所分离菌株总数 85% 以上,3 个处理分别为 85.7%、100%、94.7%。真菌优势种群详细结果见表 1。

表 1 真菌种类及优势种群

处理	健康株				染病株			
	拉丁学名	基因序列号	相似性/%	比例/%	拉丁学名	基因序列号	相似性/%	比例/%
I	<i>Alternaria alternata</i>	AB470901.1	100	42.8	<i>Fusarium solani</i>	FJ914886.1	99	85.7
	<i>Penicillium oxalicum</i>	JN851047.1	100	28.6	<i>Penicillium oxalicum</i>	JN851047.1	100	14.3
	<i>Fusarium solani</i>	FJ914886.1	99	14.3				
	<i>Phomopsis chimonanthi</i>	HQ328046.1	99	14.3				
II	<i>Alternaria alternata</i>	AB470901.1	100	40.0	<i>Fusarium solani</i>	FJ914886.1	99	100.0
	<i>Phomopsis</i> sp.	EF600961.1	98	22.3				
	<i>Fusarium solani</i>	FJ914886.1	99	21.0				
	<i>Pleosporales</i> sp.	HQ914849.1	100	16.7				
III	<i>Alternaria alternata</i>	AB470901.1	100	37.5	<i>Fusarium solani</i>	FJ914886.1	99	94.7
	<i>Fusarium solani</i>	FJ914886.1	99	20.0	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	GU997686.1	100	5.3
	<i>Peyronellaea glomerata</i>	JN986776.1	100	15.6				
	<i>Irpex lacteus</i>	EU918701.1	99	12.8				
	<i>Phomopsis chimonanthi</i>	HQ328046.1	99	9.1				

2.3 细菌优势种群及种类异同

健康株3个处理(9个样品)分离的细菌优势种群种类不同,仅 *Microbacterium* 属在健康株3个处理中均有分布,处理I、II、III主要优势种群分别为 *Janibacter melonis* Yoon、*Microbacterium hominis* Takeuchi and Hatano 和 *Microbacterium flavum* Kageyama,优势种群的菌株数量分别占所分离菌株总数的62.1%、39.6%、33.1%。染病株3个处理(9个树皮样品)分离的细菌优势种群均为 *Lonsdalea quercina* Brandy(=

Brenneria quercina(Hildebrand & Schroth) Hauben),而且其菌株数占所分离菌株总数的百分比均在67%以上,3个处理分别为82.7%、67.9%、69.8%。3个处理分离细菌非优势种类中仅有2种相同,如 *Corynebacterium variabile* (Müller, 1961) Collins, 1987 和 *C. flavescens* Barksdale, 1979 在染病株3个处理中均有分布。健康株树皮样品与染病株样品分离细菌种类差异较大,未分离到相同的物种(表2)。

表2 细菌种类及优势种群

处理	健康株				染病株				
	拉丁学名	基因 序列号	相似性 /%	比例 /%	拉丁学名	基因 序列号	相似性 /%	比例 /%	
I	<i>Janibacter melonis</i> CM2104 ^T	AY522568	99.419	62.1	<i>Lonsdalea quercina</i> LMG 2724 ^T	AJ223469	98.830	82.7	
	<i>Microbacterium flavum</i> YM18-098 ^T	AB286029	98.735	21.6	<i>Corynebacterium flavescens</i> NCDO 1320 ^T	X84441	98.287	5.0	
	<i>Pseudomonas argentinensis</i> CH01 ^T	AY691188	99.637	5.4	<i>Gibbsiella quercinecans</i> FRB 97 ^T	GU562337	98.456	5.0	
	<i>Flavobacterium oceanosedimentum</i> ATCC 31317 ^T	EF592577	99.927	2.7	<i>Corynebacterium variabile</i> DSM 20132 ^T	AJ222815	98.808	4.2	
	<i>Pseudomonas tremae</i> CFBP 6111 ^T	AJ492826	99.564	2.7	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i> DSM 20345 ^T	AJ421446	99.927	1.1	
	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> LMG 3645 ^T	AJ312209	100.000	2.7	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>indica</i> DSM 14848 ^T	EU014680	98.085	1.0	
	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 ^T	AJ575816	100.000	2.7	<i>Pantoea vagans</i> LMG 24199 ^T	EF688012	99.851	1.0	
	II	<i>Microbacterium hominis</i> IFO 15708 ^T	AB004727	98.244	39.6	<i>Lonsdalea quercina</i> LMG 2724 ^T	AJ223469	98.830	67.9
		<i>Microbacterium marinilacus</i> YM11-607 ^T	AB286020	100.000	31.2	<i>Rhodobacter maris</i> JA276 ^T	AM745438	96.777	13.6
<i>Bacillus humi</i> LMG 22167 ^T		AJ627210	98.049	24.8	<i>Corynebacterium variabile</i> DSM 20132 ^T	AJ222815	98.810	8.0	
<i>Sphingomonas molluscorum</i> KMM 3882 ^T		AB248285	99.317	3.4	<i>Hafnia alvei</i> ATCC 13337 ^T	M59155	100.000	5.4	
<i>Rathayibacter caricis</i> VKM Ac-1799 ^T		AF159364	99.707	1.0	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> DSM 6962 ^T	X81662	98.238	2.9	
III	<i>Microbacterium flavum</i> YM18-098 ^T	AB286029	99.184	33.1	<i>Lonsdalea quercina</i> LMG 2724 ^T	AJ223469	98.830	69.8	
	<i>Cellulomonas hominis</i> DMMZ CE40 ^T	X82598	99.114	30.9	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917 ^T	ACGZ 01000098	100.000	19.6	
	<i>Leclercia adecarboxylata</i> GTC 1267 ^T	AB273740	98.464	30.3	<i>Corynebacterium flavescens</i> NCDO 1320 ^T	X84441	99.881	5.0	
	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i> LPM-5 ^T	EU573216	99.851	2.4	<i>Corynebacterium variabile</i> DSM 20132 ^T	AJ222815	99.778	3.6	
	<i>Achromobacter denitrificans</i> DSM 30026 ^T	Y14907	97.868	1.9	<i>Acetobacter pomorum</i> LHT2458 ^T	AJ001632	99.773	2.0	
	<i>Luteimonas marina</i> FR1330 ^T	EU295459	98.704	1.4					
					<i>Corynebacterium flavescens</i> NCDO 1320 ^T	X84441	99.633	2.2	

2.4 可培养的真菌、细菌种类

本研究分离的真菌菌株分属于8个属的5个种和4个未鉴定种,其中,染病株3个处理分离真菌3属3个种,处理I、II、III分离真菌种类分别为2个属2个种、1个属1个种和2个属的2个种;而健康株3个处理分离7个属7个种和4个未鉴定种。

本研究分离细菌分属于24个属的29个种,其中,染病株3个处理分离真菌11属12种,处理I、II、III分离细菌种类分别为7个属7个种、5个属6个种和4个属的5个种;而健康株3个处理分离13个属17个种,处理I、II、III分离细菌种类分别为5

个属7个种、4个属5个种和6个属的6个种。

3 讨论

中林46健株和病株样品的细菌优势种群分析结果表明:健株样品与病株样品分离的种类完全不同,染病株样品优势种群均为 *L. quercina*,且3个处理的菌株数分别占所分离菌株总数的为82.7%、67.9%、69.8%,而 *C. variabile* 和 *C. flavescens* 在3个染病株样品中均有分布。*L. quercina* 是引起欧洲栎树(*Quercus ilex* L.)树干溃疡和美国栎树(*Quercus* sp.)果实病的病原菌^[12-14]。因此,推测 *L. quercina*

在我国欧美杨溃疡病致病过程中可能起着重要作用,很可能是该病害的病原菌之一,但需要进一步室内和田间的生物学接种实验证实;而 *C. variable* 和 *C. flavescens* 2 个菌种是奶酪表面常见的菌种,并在奶酪制作过程中起重要作用,*C. variable* 能够发酵蔗糖、果糖、甘露醇等产酸^[15-16],在病原菌致病过程中分解韧皮部糖醇类化合物,加速树皮组织的快速腐烂,加重病害危害程度。

贺伟等^[1]研究发现,河南濮阳、山东菏泽等地的欧美杨溃疡病病斑的分离物中,镰刀菌属真菌占优势,并通过离体枝条水培接种、盆栽苗接种和致病性测定试验证明,我国欧美杨溃疡病的病原菌为茄镰孢(*F. solani*)。本研究中,中林46杨健康株和病株树皮真菌优势种群分析结果显示:染病株样品的优势种群均为 *F. solani*,而且其菌株数量占所分离菌株总数的百分比均在85%以上,此结果与贺伟等^[1]研究结果相符,即镰刀菌属真菌占优势。健康株样品分析结果显示:*F. solani* 在3个健康株样品上均有分布,但并不是优势种群,说明 *F. solani* 是一种杨树树皮的内生真菌,在条件允许的情况下,*F. solani* 在树皮内迅速繁殖和致病。在染病样品中有1个处理分离到葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not.),葡萄座腔菌是一种杨树的弱致病菌,在树势弱时病菌才会造成杨树溃疡病,因此,葡萄座腔菌可能与该病害的病原菌协同致病,促进该病害的发生和危害。

本研究阐明了欧美杨中林46健康株和病株树皮组织主要真菌、细菌优势种群的种类,为明确病原菌与其他主要伴生微生物之间的相互关系奠定了基础,而 *L. quercina* 和 *F. solani* 在欧美杨溃疡病的致病过程中所起的作用,需要按照严格的柯赫氏法则进行室内和田间的生物学接种试验进一步证实。

参考文献:

[1] 贺伟,任飞娟,郭利民,等. 欧美杨溃疡病的病原鉴定[J]. 林业科学,2009,45(6):104-109

[2] 牟新涛,李永,李强军,等. 三峡库区云阳县三种类型马尾松林微生物区系分析 I. 林地土壤细菌、芽孢杆菌和真菌[J]. 林业科学研究,2010,23(4):560-566

[3] 牟新涛,李永,李强军,等. 三峡库区云阳县三种类型马尾松林微生物区系分析 II. 林地空气、叶面和树皮表面微生物区系[J]. 林业科学研究,2010,23(5):762-769

[4] 陈华红,杨颖,姜怡,等. 植物内生放线菌的分离方法[J]. 微生物学通报,2006,33(4):182-185

[5] 王彦芹,席琳乔. 棉花根际促生菌基因组 DNA 的提取及其鉴定[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(5):1005-1008

[6] 林彩丽,王曦苗,朴春根,等. 一种用于 PCR 扩增的真菌 DNA 快速提取方法[P]. 专利号:896003

[7] Galkiewicz J P, Kellogg C A. Cross-Kingdom Amplification, Using Bacteria-Specific Primers: Complications for Studies of Coral Microbial Ecology[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(2):7828-7831

[8] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//Innis MA, Gelfand DH, Sninsky J J, et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press, 1990: 315-322

[9] Chun J, Lee J H, Jung Y, et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57:2259-2261

[10] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979

[11] Xing X K, Chen J, Xu M J, et al. Fungal endophytes associated with Sonneratia (Sonneratiaceae) mangrove plants on the south coast of China[J]. For Path, 2011, 41:334-340

[12] Poza-Carrión C, Aguilar I, Gallego, et al. *Brenneria quercina* and *Serratia* spp. isolated from Spanish oak trees; molecular characterization and development of PCR primers[J]. Plant Pathology, 2008, 57:308-319

[13] Biosca E G, González R, López-López M J, et al. Isolation and Characterization of *Brenneria quercina*, Causal Agent for Bark Cancer and Drippy Nut of *Quercus* spp. in Spain[J]. Phytopathology, 2003, 93(4):485-492

[14] Brady C L, Cleenwerck I, Denman S, et al. Proposal to reclassify *Brenneria quercina* (Hildebrand & Schroth 1967) Hauben et al. 1999 into a novel genus, *Lonsdalea* gen. nov., as *Lonsdalea quercina* comb. nov., descriptions of *Lonsdalea quercina* subsp. *quercina* comb. nov., *Lonsdalea quercina* subsp. *iberica* subsp. nov. and *Lonsdalea quercina* subsp. *britannica* subsp. nov., emendation of the description of the genus *Brenneria*, reclassification of *Dickeya dieffenbachiae* as *Dickeya dadantii* subsp. *dieffenbachiae* comb. nov., and emendation of the description of *Dickeya dadantii*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2012, 62:1592-1602

[15] Brennan N M, Ward A C, Beresford T P, et al. Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(2):820-830

[16] Schröder J, Maus I, Trost E, et al. Complete genome sequence of *Corynebacterium variabile* DSM 44702 isolated from the surface of smear-ripened cheeses and insights into cheese ripening and flavor generation[J]. BMC Genomics, 2011, 12:545