

# 猕猴桃溃疡病病原菌的分子鉴定和致病力测定

赵利娜 胡家勇 叶振风 刘普 朱立武

安徽农业大学果树学重点实验室,合肥 230036

**摘要** 为明确猕猴桃细菌性溃疡病致病菌种类与特征,以从安徽岳西、陕西户县和重庆黔江等猕猴桃主产区收集到的溃疡病感染枝条和树皮为材料,采用平板划线、梯度稀释和BPA培养法分离病原物,采用烟草过敏性反应和猕猴桃健康叶片接种观察其致病性,结合特异引物扩增的16S-23S rDNA-ITS序列分析,对病原菌种类进行分子鉴定。结果表明:从收集的溃疡病感染枝条和树皮中,共分离纯化得到10株分离物;所有分离物均可使烟草叶片产生过敏反应,猕猴桃叶片接种显示同一菌株对不同品种及不同菌株对同一品种的致病力均存在差异。对特异扩增得到的280 bp 16S-23S rDNA-ITS序列进行Blast比对分析,结果表明:10个菌株为同一致病菌,其DNA片段大小和序列均与丁香假单胞杆菌猕猴桃致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidae*)完全一致。据此可以确定,试验分离所得的菌株均为丁香假单胞杆菌猕猴桃致病变种。

**关键词** 猕猴桃; 溃疡病; 丁香假单胞杆菌; 鉴定; 致病力

**中图分类号** S 436.634.1<sup>+</sup>2; S 663.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)05-0604-05

中国是猕猴桃属植物(*Actinidia* spp.)的起源中心。猕猴桃果实营养丰富、富含Vc,被誉为水果之王。目前,中国猕猴桃栽培面积世界第一,达6.67万hm<sup>2</sup>,年产量45.8万t。近年来,由于猕猴桃种植面积迅速扩大,猕猴桃细菌性溃疡病(kiwifruit bacterial canker)传播迅速,病害威胁日益增加,危害程度日趋严重。此病在日本、美国、韩国、新西兰及意大利等国家曾相继被发现<sup>[1-2]</sup>,最近在法国、葡萄牙、西班牙、瑞士和智利等国家也有相关报道<sup>[3-6]</sup>。在中国,首先在湖南、安徽、陕西、四川等地区发现猕猴桃细菌性溃疡病,现已扩展到猕猴桃多数主产区,造成的经济损失巨大<sup>[7]</sup>。

猕猴桃细菌性溃疡病是一种毁灭性病害,由丁香假单胞杆菌猕猴桃致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidae*)引起,主要为害猕猴桃的主干、枝干和叶片。在猕猴桃枝干上表现为病部溢出大量初为乳白色,然后变成红褐色的粘液,随后上部枝条萎蔫死亡。在植株叶片上则表现为能产生边缘有黄色晕圈的近圆形褐色病斑<sup>[8]</sup>。

目前,有关猕猴桃细菌性溃疡病病原菌鉴定的研究很多,但大多集中于病原菌的形态学和生理生化

特性等传统的鉴定方法<sup>[9-10]</sup>。近年来,利用16S rDNA和16S-23S rDNA间隔区序列(ITS)对细菌近缘种(related species)、致病品种(pathogenic variety)和菌株(strain)的区分和鉴定等研究倍受关注<sup>[11-12]</sup>。猕猴桃细菌性溃疡病病原菌的快速、准确鉴定,是溃疡病病原菌生理生态、遗传变异和病害防控研究的前提。笔者从安徽岳西、陕西户县和重庆黔江等猕猴桃主产区收集到的溃疡病感染枝条和树皮,在分离纯化病原物后,对获得的溃疡病致病菌株进行了16S-23S rDNA-ITS分子鉴定,并通过人工接种,分别测定各菌株对猕猴桃不同品种的致病力,旨在为猕猴桃细菌性溃疡病的病原菌鉴定和病害防控提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

2010年10月至2011年5月,分别于安徽岳西、陕西户县和重庆黔江等猕猴桃主产区,在发病初期采集金丰、红阳(中华猕猴桃 *Actinidia chinensis* Planch)和秦美、海沃德(美味猕猴桃 *Actinidia deliciosa* Planch)等猕猴桃品种的溃疡病感染枝条和树皮。

收稿日期:2012-01-13

基金项目:安徽省重点科研计划项目(07020303049)

赵利娜,硕士研究生。研究方向:园艺植物遗传育种。E-mail:zhaoulina688@126.com

通讯作者:朱立武,教授。研究方向:果树资源与生物技术育种。E-mail:zhuliwu@ahau.edu.cn

烟草过敏性反应供试材料为温室盆栽烟草植株;猕猴桃致病性检测采用皖金、魁蜜、金阳、红阳、秦美、皖翠、徐香、金魁、金丰和海沃德等10个猕猴桃品种的健康叶片,于2011年5—6月取自安徽省霍邱县皖西猕猴桃研究所。

肉汁琼脂培养基(BPA):牛肉浸膏3.0 g/L,蛋白胨5~10 g/L,蔗糖10.0 g/L,酵母膏1.0 g/L,琼脂17.0 g/L, pH 7.0。

病原菌致病性检测的对照菌株7286、7285和7287,由意大利托斯卡纳大学Giorgio M. Balestra教授惠赠。

## 1.2 病原菌的分离与纯化

取新鲜病健交界处的病组织,洗净后切成4 mm×4 mm小块,无菌水冲洗3次后分别用70%乙醇和0.5%~1.0%的次氯酸钠消毒1~2 min。取出用无菌水冲洗3次后,分别按下列方法进行分离。I. 平板划线培养法:将处理后的病组织放在灭菌载玻片上,加1滴无菌水并以玻璃板搅碎,静置后直接划线培养;II. 培养皿稀释分离法:取培养皿加0.5 mL无菌水后,将处理后的病组织小块移至培养皿中,玻璃棒碾碎后静置30 min,充分混匀后梯度稀释。将熔化的固体培养基冷却至45℃左右后倒入到含有0.5 mL梯度稀释菌悬液的培养皿中,充分混匀后置25℃培养箱倒置培养。

## 1.3 病原菌的鉴定

取病健交界处组织1块,置于载玻片上并向其加1~2滴无菌水,加盖玻片后立即用低倍显微镜观察水滴与组织交界处的菌溢情况。

参照Rees-George等<sup>[13]</sup>的方法进行16S-23S rDNA分子鉴定。特异引物PsaF1(5'-TTTTGCTTTGCACACCCGATTT-3')和PsaR2(5'-CACGCACCCTTCAATCAGGATG-3'),由上海生物工程技术有限公司合成;反应体系为25 μL,其中不含Mg<sup>2+</sup>的10×buffer 1.5 μL, 10 mmol/L dNTP 0.5 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL, 10 μmol/L上游引物1.25 μL, 10 μmol/L下游引物1.25 μL, 5 U/μL Taq酶0.062 μL, DNA模板2 μL, 无菌去离子水16.938 μL; PCR扩增反应程序为95℃ 2 min; 94℃ 15 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30个循环; 72℃ 5 min。PCR扩增产物经2%琼脂糖凝胶检测后,回收纯化目的片段送华大基因公司测序。

将测序结果通过Blast比对,作同源性相似度

差异性分析,利用Clustal X 1.83软件对序列进行多重比较,采用BioEdit程序和MEGA 4.0软件以N-J法构建系统聚类树,分析其亲缘关系<sup>[14-15]</sup>。

## 1.4 病原菌的致病力测定

1)烟草过敏性反应。烟草过敏性检测参照承河元等<sup>[7]</sup>的方法进行。将26℃下培养72 h的各菌株用无菌水配制成3.0×10<sup>8</sup> cells/mL的菌悬液。取2 μL菌悬液对6叶龄的烟叶叶片作下表皮皮下注射,置25℃培养24 h后观察其过敏性反应。

2)猕猴桃叶片接种。选取A17、A18、SXQM、SXHWD、C33菌株,以意大利菌株7285、7286和7287为对照,对猕猴桃健康叶片进行离体接种。取2 μL菌悬液,利用表皮皮下注射法,接种到皖金、魁蜜、金阳、红阳、秦美、皖翠、徐香、金魁、金丰和海沃德等10个猕猴桃品种的健康叶片上,置于16℃恒温保湿培养7 d后,观察其发病情况并以游标卡尺测定病斑直径(mm)。对于某一特定品种而言,病斑直径越大,表示菌株的致病力越强。

## 1.5 数据处理

所有试验数据,均采用SPSS 11.0软件进行差异显著性分析。

# 2 结果与分析

## 2.1 菌株的细菌性检测

从安徽岳西、陕西户县和重庆黔江等猕猴桃主产区收集到的溃疡病感染枝条和树皮中,共分离纯化得到10株分离物(表1)。检测结果表明,10株分离病原物的形态特征基本一致,在BPA培养基上菌落呈圆形、污白色,全缘、微凹、光滑,生长缓慢,直径1~3 mm。细菌性检测有喷菌现象,显示分离病原物为细菌。

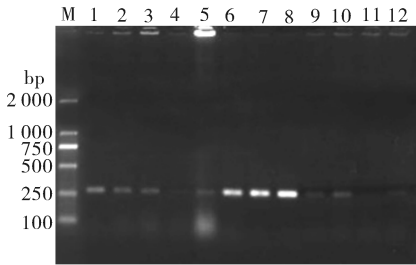
表1 不同猕猴桃溃疡病菌株的分离

Table 1 Strains of different kiwifruit bacterial canker isolates

菌株 Strain	寄主 Host	来源地 Origin
SXQM	秦美 Qinmei	陕西户县 Huxian, Shaan'xi
SXHWD	海沃德 Hayward	陕西户县 Huxian, Shaan'xi
A18	金丰 Jinfeng	安徽岳西 Yuexi, Anhui
A17	金丰 Jinfeng	安徽岳西 Yuexi, Anhui
C33	红阳 Hongyang	重庆黔江 Qianjiang, Chongqing
SXHYY	红阳 Hongyang	陕西户县 Huxian, Shaan'xi
AKA5	金丰 Jinfeng	安徽岳西 Yuexi, Anhui
AKB5	金丰 Jinfeng	安徽岳西 Yuexi, Anhui
AK14	金丰 Jinfeng	安徽岳西 Yuexi, Anhui
AK18	金丰 Jinfeng	安徽岳西 Yuexi, Anhui

## 2.2 菌株的 16S-23S rDNA ITS 分子鉴定

以分离病原物和意大利对照菌株的基因组 DNA 为模板,应用特异引物 PsaF1 和 PsaR2 进行 PCR 扩增,均获得片段长度约 300 bp 的目的条带(图 1)。



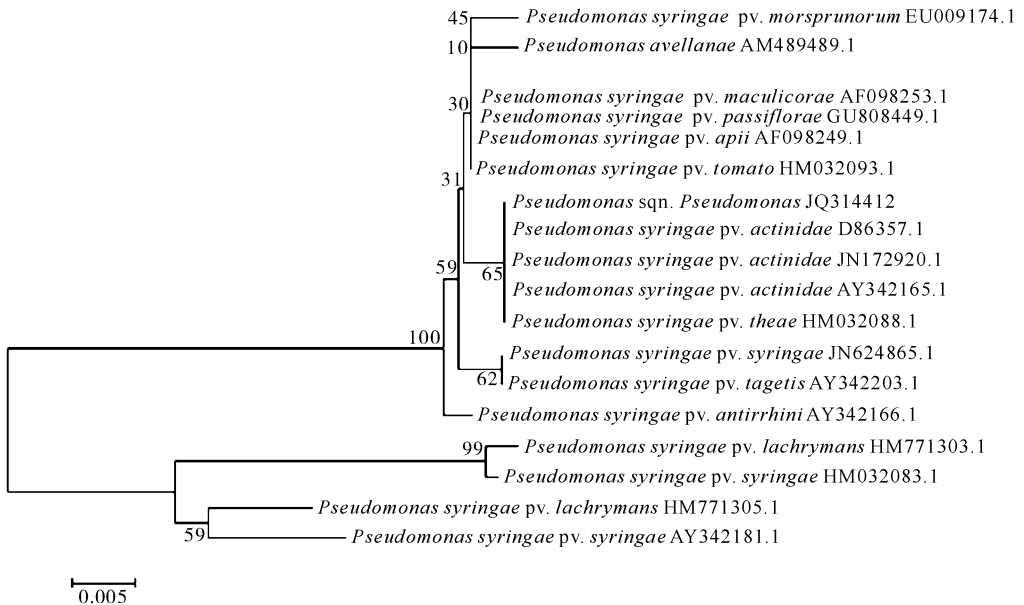
M: Marker; 1: SXQM; 2: SXHWD; 3: A18; 4: A17; 5: C33; 6: 7287; 7: 7285; 8: 7286; 9: AKB5; 10: AK14; 11: AK18; 12: AKA5.

图 1 16S-23S rDNA-ITS 琼脂糖的电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis of PCR reactions of 16S-23S rDNA-ITS in agarose gel

将不同菌株的 PCR 产物分别回收纯化,经测序分析发现,10 株致病菌的 DNA 片段大小一致,均为 280 bp,且序列相同。由此可见,所分离纯化的 10 株菌为同一致病菌。测序结果在 GenBank 数据库中的登录号为 JQ314412。Blast 分析结果显示,该序列与丁香假单胞杆菌猕猴桃致病变种(*P. syringae* pv. *actinidae*)已报道的菌株 JN172920.1、HM032088.1、D86357.1 和 AY342165.1 等的 16S-23S rDNA ITS 序列一致。

从构建的进化树可以看出,分离物与丁香假单胞杆菌猕猴桃致病变种 JN172920.1、HM032088.1、D86357.1 及 AY342165.1 菌株的亲缘关系最近(图 2),但是不能与丁香假单胞杆菌茶叶致病变种(*P. syringae* pv. *theae*)区分。因此,结合取样寄主和致病性检测结果,可以确定本试验分离所得的菌株为丁香假单胞杆菌猕猴桃致病变种(*P. syringae* pv. *actinidae*)。



分支左侧数值为聚类自举支持率。Bootstrap values are shown on the left of branches.

图 2 基于 16S-23S rDNA ITS 序列的进化树(MEGA3.1)

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S-23S rDNA ITS sequences (MEGA3.1)

## 2.3 菌株致病力的差异分析

按照科赫法则,将分离的病原物接种到烟草健康的叶片上,接种 24 h 后烟草叶片呈现黄色枯斑,即产生了过敏性反应。

选取 A17、A18、SXQM、SXHWD、C33 菌株,以意大利菌株 7285、7286、7287 为对照,对猕猴桃健康

叶片进行离体接种。接种的菌株均可使猕猴桃品种健康叶片致病。

数据统计分析发现,不同菌株对于同一品种的致病力存在差异,如皖金接种不同菌株后,A18 菌株病斑最大直径达 3.75 mm,表现致病力最强,SX-QM 菌株病斑最大直径为 1.00 mm,表现致病力较

弱,两者之间差异达到显著水平( $P < 0.05$ );同一菌株对不同品种的致病力也存在差异,如C33菌株对金阳致病能力最强,病斑直径达13.00 mm,对魁蜜致病力最弱,病斑直径只有1.00 mm,两者差异显

著。从每个菌株对各品种的致病力看,7285菌株的病斑平均值为4.25 mm,致病力最强, SXQM菌株的病斑平均值为1.75 mm,致病能力最弱。其余菌株致病力介于两者之间(表2)。

表2 不同菌株对猕猴桃品种致病力(病斑直径)的差异<sup>1)</sup>

Table 2 Different pathogenicity (spot diameter) of kiwifruit caused by various isolates of bacterial canker

菌株 Isolates	皖金 Wanjin	秦美 Qinmei	皖翠 Wancui	魁蜜 Kuimi	金魁 Jinkui	徐香 Xuxiang	海沃德 Hayward	金阳 Jinyang	红阳 Hongyang	金丰 Jinfeng	平均值 Average
7286	1.98 ab	2.30 b	3.50 b	2.45 ab	3.38 a	2.38 a	2.18 b	3.43 c	2.20 cd	3.68 a	2.75 ab
7285	2.37 ab	1.27 b	10.83 a	5.87 a	2.10 abc	1.60 a	7.70 a	8.23 bc	1.43 cd	3.77 a	4.52 a
SXQM	1.50 b	1.00 b	1.00 b	3.50 ab	1.00 c	1.50 a	0.75 b	4.50 c	1.25 d	1.50 a	1.75 b
7287	3.25 ab	1.10 b	2.10 b	4.50 ab	1.40 bc	1.45 a	2.00 b	10.45 ab	9.75 a	3.75 a	3.98 ab
SXHWD	1.60 ab	2.95 ab	4.25 b	3.25 ab	2.75 ab	3.00 a	1.85 b	4.40 c	3.75 bcd	2.40 a	3.02 ab
A18	3.75 a	3.75 ab	3.65 b	3.95 ab	1.50 bc	4.10 a	2.65 b	4.65 c	5.15 b	2.65 a	3.58 ab
A17	2.50 ab	5.50 a	2.25 b	1.00 b	1.65 bc	1.75 a	4.50 ab	3.80 c	3.85 bc	1.50 a	2.83 ab
C33	3.25 ab	3.10 ab	1.05 b	1.00 b	1.10 c	1.50 a	3.75 ab	13.00 a	3.25 bcd	2.00 a	3.30 ab

1)数据后不同字母表示在5%水平上差异显著。Data with the different letters in column are significant difference at 5% level.

### 3 讨论

猕猴桃细菌性溃疡病已严重威胁到中国猕猴桃产业的可持续发展,病原菌的快速、准确鉴定是猕猴桃细菌性溃疡病的病原菌研究和溃疡病有效防治措施的重要课题,也是目前世界猕猴桃病害及其防治工作者研究的热点。传统的细菌鉴定主要以形态学、生理学和生态学特征为主,如承河元等<sup>[7]</sup>和梁英梅等<sup>[11]</sup>已通过传统方法对中国猕猴桃溃疡病进行了分类鉴定,但由于细菌形体微小、结构简单,加上丁香假单孢菌的致病亚种或变种众多,各亚种与变种之间大小、形态等差异更微小,给丁香假单孢菌种类的准确鉴定带来了很大难度。分子鉴定具有快速、准确、高效等特点。16S-23S rDNA ITS为16S rDNA基因与23S rDNA基因之间的区间序列,进化压力较小,序列易发生变异,因此16S-23S rDNA ITS序列分析在细菌种类鉴定中具有重要价值,现已在微生物的鉴定领域得到广泛应用。

针对猕猴桃细菌性溃疡病菌,Rees-George等<sup>[13]</sup>和Han等<sup>[16]</sup>分别通过16S rDNA和16S-23S rDNA-ITS对丁香假单孢菌进行了快速、准确鉴定,国内在这方面研究还未见报道。笔者利用16S-23S rDNA ITS序列进行分析,鉴定出中国安徽岳西、陕西户县及重庆黔江等猕猴桃主产区猕猴桃细菌性溃疡病的致病种均为丁香假单孢杆菌猕猴桃致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)。

从菌株的16S-23S rDNA ITS序列来看,世界各地分离得到的丁香假单孢杆菌猕猴桃致病变种的

16S-23S rDNA ITS序列没有发生改变。但是,不同来源菌株对同一猕猴桃品种,以及同一溃疡病菌株对不同猕猴桃品种的致病力确实存在显著差异。可以推断,不同生态条件下菌株的致病机制可能发生了变化。有关猕猴桃细菌性溃疡病不同病原菌致病力差异的分子机制还有待进一步研究。

### 参 考 文 献

[1] OPGENORTH D C, LAI M, SORRELL M, et al. *Pseudomonas* canker of kiwifruit [J]. *Plant Disease*, 1983, 67(11): 1283-1284.

[2] TAKIKAWA Y, SERIZAWA S, ICHIKAWA T, et al. The causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan [J]. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 1989, 55(4): 437-444.

[3] ABELLEIRA A, LOPEZ M M, PENALVER J, et al. First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Spain [J]. *Plant Disease*, 2011, 95(12): 1583.

[4] BALESTRA G M, MAZAGLIA A, QUATTRUCCI A, et al. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Jin Tao kiwi plants in Italy [J]. *Phytopathologia Mediterranea*, 2009, 48(2): 299-301.

[5] BALESTRAG M, RENZI M, MAZZAGLIA A, et al. First report of bacterial canker of *Actinidia deliciosa* caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Portugal [J]. *New Disease Reports*, 2010, 22: 10.

[6] VANNESTE J, POLIAKOFF F, AUDUSSEAU C, et al. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* the causal agent of bacterial canker of kiwifruit on *Actinidia deliciosa* in France [J]. *Plant Disease*, 2011, 95(10): 1311.

[7] 承河元, 李瑶, 万嗣堃, 等. 安徽省猕猴桃溃疡病菌鉴定[J]. *安徽农业大学学报*, 1995, 22(3): 219-223.

- [8] 朱晓湘, 方炎祖, 廖新光. 猕猴桃溃疡病病原研究[J]. 湖南农业科学, 1993(6): 31-33.
- [9] SCHAAD N W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria [M]. Washington: American Phytopathological Society Press, 1980: 70-72.
- [10] 梁英梅, 张星耀, 田呈明, 等. 陕西省猕猴桃枝干溃疡病病原菌鉴定[J]. 西北林学院学报, 2000, 15(1): 37-39.
- [11] 焦振泉, 刘秀梅. 细菌分类与鉴定的新热点: 16S-23S rDNA 间区[J]. 微生物学报, 2001, 28(1): 85-89.
- [12] 付鹏, 郭亚辉, 张晓梅, 等. 番茄溃疡病菌分子检测技术[J]. 江苏农业学报, 2005, 21(2): 118-122.
- [13] REES-GEORGE J, VANNESTEJ L, CORNISH D A, et al. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S-23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions [J]. Plant Pathology, 2010, 59: 453-464.
- [14] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molecular Biological Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [15] 毛华明, 马松成, 陈静, 等. 大额牛瘤胃细菌 16S rRNA 基因序列分析[J]. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3769-3775.
- [16] HAN H S, KOH Y J, HUR J W, et al. Identification and characterization of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003, 13(1): 110-118.

## Molecular identification and pathogenicity detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

ZHAO Li-na HU Jia-yong YE Zhen-feng LIU Pu ZHU Li-wu

Key Laboratory Pomology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

**Abstract** To identify the pathogenic bacteria of kiwifruit bacterial canker, the infected kiwifruit branches and barks from Anhui (Yuexi County) Province, Shaan'xi (Huxian County) Province and Chongqing (Qianjiang County) Municipality were collected as the experiment materials. Plate streaking, gradient dilution and beef extract peptone agar (BPA) media cultivation were used for bacteria isolation, and tobacco hypersensitive responses detection, kiwifruit pathogenicity detection and 16S-23S rDNA-ITS sequential analysis were carried out as follows for bacteria identification. From the bacterial canker infected kiwifruit tissues, 10 pathogenic strains were isolated, and all isolated strains have pathogenicity and hypersensitivity to tested kiwifruit and tobacco leaves. However, different isolated strains have different pathogenicity for kiwifruit. 10 purified pathogenic strains belonged to the same pathogen through 16S-23S rDNA-ITS and Blast sequential analysis. The amplified 280 bp sequences were the same as the previously reported 16S-23S rDNA-ITS of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. It is concluded that the isolates from the canker infected kiwifruit branches and barks were *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.

**Key words** kiwifruit; canker disease; *Pseudomonas syringae*; identification; pathogenicity

(责任编辑:陈红叶)