

辽宁省番茄细菌性斑疹病的病原鉴定

苗则彦* 李颖 赵杨

(辽宁省农业科学院 辽宁省农作物有害生物控制重点实验室 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 【目的】对在辽宁部分地区采集的番茄细菌性病害病原菌进行鉴定。【方法】对病原菌进行革兰氏染色、培养性状、生理生化特性、16S rRNA 基因序列测定以及 *hrpZpst* 基因特异性扩增。【结果】鉴定该病原菌为丁香假单胞杆菌番茄致病变种 [*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young, Dye & Wilkie]。【结论】利用 *hrpZpst* 基因特异性扩增可以快速鉴定病原菌。

关键词: 番茄细菌性斑疹病, 丁香假单胞杆菌番茄致病变种, *hrpZpst* 基因

Pathogen identification of bacterial speck of tomato in Liaoning

MIAO Ze-Yan* LI Ying ZHAO Yang

(Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Liaoning Key Laboratory of Crop Pest Management, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: [Objective] Identification of bacterial disease of tomato in Liaoning. [Methods] According to result of the pathogenicity, physiological and biochemical characterizations, 16S rDNA sequence and specific amplification of *hrpZpst* gene. [Results] The isolates were identified as *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe). [Conclusion] *hrpZpst* gene can be used to identify *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe).

Keywords: Bacterial speck of tomato, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *hrpZpst* gene

*通讯作者: ✉: endobacteria@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-05-17; 接受日期: 2012-11-15

番茄斑疹病[*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Okabe) Young, Dye & Wilkie]是番茄上一种细菌性病害, 主要危害番茄叶片、茎秆和果实, 幼嫩果实初期的小斑点稍隆起, 果实近成熟时病斑周围仍保持较长时间的绿色。病斑附近果肉略凹陷。病斑周围黑色, 中间色浅并有轻微凹陷, 影响果实产量, 给生产造成一定经济损失。目前在欧洲、北美洲、澳大利亚^[1]、非洲^[2]以及亚洲^[3]均有发生。

近年在沈阳市新民、苏家屯等地区危害十分严重, 部分温室绝收。早在 2001 年辽宁地区就曾有报道^[4-5], 另外在吉林省、黑龙江省、河北省、天津市^[3]、新疆维吾尔自治区^[6]、福建省^[7]均有不同程度的发生, 其中在 2006-2007 年间甘肃省张掖地区发病率在 40% 以上, 严重时甚至达到 100%^[8]。近几年该病害在全国范围内呈蔓延趋势, 危害逐年加重, 应引起高度重视。

本研究在常规的病原菌生理生化鉴定、16S rRNA 鉴定基础上, 在国内首次采用 *hrpZpst* 基因特异性序列鉴定方法, 完成病原菌的快速、准确鉴定。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

供试的 10 个菌株于 2010 年从辽宁省沈阳市大民屯镇保护地番茄病叶和病茎秆上分离, 并经纯化后保存; 对照菌株为番茄细菌性斑疹病的标准菌株 DC3000 (由中国北京生命科学研究所周俭民博士惠赠)。

1.2 病原菌的分离纯化

参照方中达^[9]的方法: 分离组织表面消毒后用无菌水冲洗, 再用灭菌解剖刀切取病健交界部位, 置于灭菌的培养皿内, 加少量无菌水捣烂, 静置 30 min, 然后用接种环蘸取该组织液在 NA 培养基上划线, 长出单菌落后用该培养基按常规方法纯化。纯化后的菌株转接到斜面培养基上,

培养后保存在冰箱(4 °C)中备用。

1.3 致病性的测定

将分离获得的 10 个菌株在 NA 平板上培养 24 h, 配成浓度为 5×10^7 CFU/mL 的细菌悬浮液, 将悬浮液喷雾接种到供试植物叶片上, 设无菌水接种作对照。25 °C 下用塑料薄膜保湿 7 d 后观察发病情况, 然后将发病的叶片进行细菌的再分离和纯化。

1.4 细菌的形态观察、培养性状、生理生化反应测定

参照文献[9-11]的方法进行。

1.5 16S rRNA 基因的鉴定

选用供试菌株中的一个菌株与对照菌株 DC3000, 采用细菌基因组提取试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit)进行细菌 DNA 提取, 进行部分 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及 DNA 片段回收, 由北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。引物为 16S rRNA 基因的通用引物(16SF: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCA-3'; 16SR: 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'), 由宝生物工程(大连)有限公司合成。PCR 扩增反应使用天根 2×*Taq* PCR MASTER Mix, 体系为 25 μL, 其中 1.0 μL DNA 模板, 0.5 μL 引物 16SF, 0.5 μL 引物 16SR, 10.5 μL ddH₂O。PCR 反应程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。将所测序列在 GenBank 核酸序列数据库中已有的其他 16S rRNA 序列数据进行同源性分析。

1.6 *hrpZpst* 基因特异性扩增

病组织液的制备: 取病原菌回接后, 长有约 0.25 cm² 面积病斑的叶片, 表面冲洗干净, 加入 20 μL ddH₂O 中研磨, 20 min 后取其上清液进行 PCR 反应。

细菌悬浮液的制备: 取 KB 培养基上培养 24 h 的细菌, 用 ddH₂O 稀释为 1×10^5 CFU/mL。

供试菌株和对照菌株 DC3000 的细菌 DNA 提取参照 1.5 方法, 特异性引物为 MM5F (5'-GAA CGAGCTGAAGGAAGACA-3')、MM5R (5'-CAG CCTGGTTAGTCTGGTTA-3')^[12]。PCR 扩增反应使用天根 2×Taq PCR MASTER Mix, 体系为 25 μL, 其中分别取 1.0 μL 病原菌悬浮液、DC3000 悬浮液和病组织研磨液, 0.5 μL 引物 MM5F, 0.5 μL 引物 MM5R, 12.5 μL Mix, 10.5 μL ddH₂O。反应程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 36 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物送交沈阳鼎国生物技术有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 病原菌分离

共分离获得 10 株病原菌菌株, 纯化后用于致病性的测定和病原菌的鉴定。

2.2 病原菌致病性测定

测定的 10 个菌株均能产生与田间发生相同的症状。接种后从发病的病斑上又重新分离到菌落形态特征相同的菌株, 经柯赫氏法则验证这 10 个菌株均为该病的病原菌, 且各菌株间致病性没有明显差异。

2.3 形态和生理生化鉴定

2.3.1 培养性状: 供试菌株在 KB 培养基(28 °C) 上培养 48 h, 形成圆形菌落呈乳白色, 全缘, 不透明, 表面光滑, 粘稠状。

2.3.2 病原细菌的形态和染色反应: 供试菌株的菌体呈短杆状, 大小为(0.1–1.0) μm×(1.5–5.0) μm, 有 1–4 根极生鞭毛, 无芽孢, 无荚膜, 革兰氏染色呈阴性。

2.3.3 生理生化性状: 详见表 1。

表 1 供试菌株和对照菌株的生理生化测定
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the tested strains and DC3000

测定项目 Characteristics	供试菌株 Strains	对照菌株 DC3000 CK strain	测定项目 Characteristics	供试菌株 Strains	对照菌株 DC3000 CK strain
KB 培养基上产荧光 Fluores centpigment on KB	+	+	D-木糖 D-xylose	+	+
氧化酶 Oxidase	-	-	D-葡萄糖 D-gluconate	+	+
PHB 积累 PHB accumulation	-	-	D-阿拉伯糖 D-arabinose	-	-
从蔗糖产果聚糖 L evan formation	+	+	蔗糖 Sucrose	-	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+	乳糖 Lactose	-	-
淀粉水解 Hydrolysis of starch	-	-	麦芽糖 Maltose	-	-
41 °C 生长 Growth at 41 °C	-	-	海藻糖 Trehalose	-	-
硫化氢产生 H ₂ S production	-	-	纤维二糖 Cellobiose	-	-
精氨酸双水解酶 Arginine reaction	-	-	丙三醇 Glycerine	+	+
甘露醇 Mannit	+	+	山梨醇 Sorbitol	+	+

2.4 16S rRNA 基因序列测定

经 PCR 扩增后, 供试菌株和 DC3000 的 16S rRNA 片段长为 1 244 bp, 经 BLAST 比对发现该菌株与已登录的 FJ590508.1 *Pseudomonas syringae* pv. tomato 和 AE016853.1 *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 相似率达到 100%。初步确定病原菌属于丁香假单胞菌组群, 结果见图 1。

2.5 hrpZpst 基因特异性扩增

PCR 扩增后, 病组织液、病菌和对照菌株 DC3000 悬浮液均出现 500 bp 左右的 *hrpZpst* 基因特异性片段, 见图 2。根据测序结果比对, 病组织液和病菌 *hrpZpst* 基因特异性片段序列的最大相似度为 100%, 与菌株 DC3000 的最大相似度为 99%, 分别与 GenBank 中已登录的 JQ083378、JQ083377 (*Pseudomonas syringae* pv. tomato) 等 20 余个菌株、AY325899 (*Pseudomonas syringae* pv. maculicola)、AE016853 (*Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000) 菌的 *hrpZpst* 基因特异性片段序列进行 BLAST 比对, 最大相似度为 99%。试验

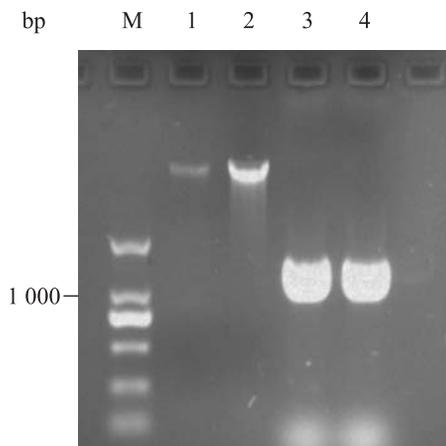


图 1 16S rDNA PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 1 The agarose electrophoresis of 16S rDNA PCR products

注: M: Marker DL2000; 1: 病原菌基因组 DNA; 2: DC3000 基因组 DNA; 3: 病原菌; 4: DC3000。

Note: M: Marker DL2000; 1: Genome DNA of pathogen; 2: Genome DNA of DC3000; 3: Pathogen; 4: DC3000.

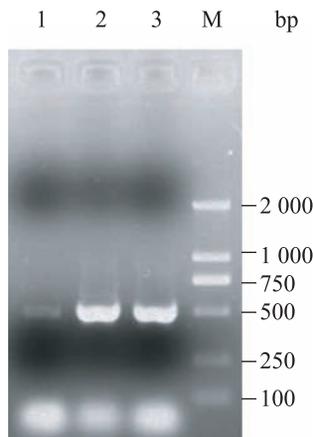


图 2 *hrpZpst* 基因的 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 2 The agarose electrophoresis of *hrpZpst* PCR products

注: M: Marker DL2000; 1: 病组织液; 2: 病原菌; 3: DC3000。

Note: M: Marker DL2000; 1: Extracts of infected leaves; 2: pathogen; 3: DC3000.

用对照菌株 DC3000 的 *hrpZpst* 基因特异性片段序列与已登录的 AY325899 (*Pseudomonas syringae* pv. maculicola) 和 AE016853 (*Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000) 最大相似度为 100%。

结果表明, 回接后发病叶片的病原菌与分离纯化的病原菌为同一种致病菌, 在 GenBank 中比对与丁香假单胞杆菌番茄致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. tomato) 具有很高相似度。试验结果表明本项试验用 DC3000 菌株的 *hrpZpst* 基因特异性片段序列与 *Pseudomonas syringae* pv. maculicola 的完全一致。

3 结论与讨论

根据病原菌培养形状、病原细菌形态、生理生化性状、16S rRNA 基因的鉴定以及 *hrpZpst* 基因特异性扩增, 鉴定该病原菌为丁香假单胞杆菌番茄致病变种 [*Pseudomonas syringae* pv. tomato (Okabe) Young, Dye & Wilkie]. Zaccardelli M. 等^[12] 研究表明, 利用 *hrpZpst* 基因特异性扩增可以鉴定病原菌, 可进行显症和未显症病叶以及种子的快速检测。Lamichhane J. R. 等^[13] 于 2010 年利用

生理生化测定和 *hrpZpst* 基因在尼泊尔首次发现了番茄斑疹病。国内还没有 *hrpZpst* 基因特异性扩增检测 *P. syringae* pv. *tomato* 的相关报道。另外, Biolog 鉴别系统在细菌的鉴定中有广泛应用, Shenge K. C. 利用 Biolog 鉴别系统在 56 株菌株中鉴别出 53 株 *P. syringae* pv. *tomato*, 而实际上只有 23 株为 *P. syringae* pv. *tomato*, Biolog 鉴别系统在 *P. syringae* pv. *tomato* 的鉴定中有一定局限性。Shenge K. C. 等^[1]利用 RFLP 分析表明 *hrpZpst* 基因在各个菌株中具有高度保守性, 利用 *hrpZpst* 基因特异性扩增可以对 *P. syringae* pv. *tomato* 进行检测。一直以来 DC3000 被认为是 *P. syringae* pv. *tomato* 菌的标准菌株^[14-16], 本次试验测定 DC3000 菌株的 *hrpZpst* 基因特异性片段序列与 *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 的完全一致。Gironde S. 等^[17]最新研究发现, 通过 *gyrB* 和 *rpoD* 基因序列分析, 从遗传发育的角度认为 DC3000 可能为 *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCul.) Young et al.。对于这个结论应该引起广泛关注。

我国于 2005 年将丁香假单胞菌斑点致病变种 *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCul.) Young et al. 定名为十字花科黑斑病菌, 并列入农业植物检疫性有害生物名单。

从已发病地区调查结果看, 有相当一部分温室种植番茄连续多年从未发病, 但目前病害却突然发生且相当严重。种子带菌是突出问题, 种子的病菌检测应引起足够重视, 应用 *hrpZpst* 基因特异性扩增检测种子对农业生产具有现实的意义。

参 考 文 献

- [1] Shenge KC, Stephan D, Mabagala RB, et al. Molecular characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* isolates from Tanzania[J]. *Phytoparasitica*, 2008, 36(4):338-351.
- [2] Shenge KC, Mabagala RB, Mortensen CN. Evaluation of locally available tomato varieties and introductions for resistance to bacterial speck and bacterial spot diseases in Tanzania[J]. *Journal of Plant Protection Research*, 2007, 47(2): 103-111.
- [3] 赵廷昌, 孙福在, 李明远, 等. 番茄细菌性斑点病的发生与防治[J]. *中国蔬菜*, 2004, (4): 64.
- [4] 赵廷昌, 孙福在, 宋文生. 番茄细菌性斑点病原菌鉴定[J]. *植物病理学报*, 2001, 31(1): 37-42.
- [5] 刘秋, 田秀铃, 孟祥林, 等. 番茄细菌性斑点病原鉴定的初步研究[J]. *辽宁农业科学*, 2001(1): 42-43.
- [6] 王晓辉, 李国英, 任毓忠, 等. 新疆加工番茄细菌性斑点病原菌鉴定[J]. *西北农业学报*, 2006, 15(2): 72-74.
- [7] 杨春泉, 陈宜修, 林玉, 等. 福建省番茄细菌性斑点病的病原鉴定[J]. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2008, 37(6): 570-574.
- [8] 邓刚, 屈星, 陈秀蓉, 等. 甘肃番茄细菌性斑点病原菌鉴定[J]. *植物保护*, 2008, 34(5): 47-51.
- [9] 方中达. *植病研究方法*[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [10] 东秀珠, 蔡妙英. *常见细菌系统鉴定手册*[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [11] 胡方平. 非荧光植物假单胞菌(*Pseudomonas* spp.) 的分类和鉴定[D]. 福州: 福建农业大学士学位论文, 1997.
- [12] Zaccardelli M, Spasiano C, Bazzi C, et al. Identification and in planta detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using PCR amplification of *hrpZpst*[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2005, 111(1): 85-91.
- [13] Lamichhane JR, Kshetri MB, Mazzaglia A, et al. Bacterial speck caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* race 0: first report in Nepal[J]. *Plant Pathology*, 2010, 59(2): 401.
- [14] Jones AM, Lindow SE, Wildermuth MC. Salicylic

[1] Shenge KC, Stephan D, Mabagala RB, et al. Molecular characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* isolates from Tanzania[J].

