

文章编号: 1674-7054(2013)04-0327-05

红掌细菌性叶枯病病原菌的分离与鉴定

梁丽雯^{1,2}, 任希望¹, 高志亮¹, 符秀梅¹, 林道哲¹, 罗红丽¹, 陈银华^{1,2}

(1. 海南大学 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室, 海口 570228;

2. 海南大学 农学院, 海口 570228)

摘要: 采用组织分离法, 从发病的红掌叶片上分离、纯化病原菌, 对纯化的病原菌进行菌落形态、致病性、生化特性测定, 并对细菌特异基因 ABC transporter 进行分离及序列分析。结果表明, 分离得到的病原菌为地毯草黄单胞菌属细菌, 为红掌的致病菌。

关键词: 红掌; 细菌性叶枯病; 病原菌鉴定; 地毯草黄单胞菌属(*Xanthomonas axonopodis*)

中图分类号: S 682.1⁺4

文献标志码: A

红掌(*Anthurium andraeanum*) 是多年生常绿草本花卉, 又名灯台花, 隶属天南星科花烛属, 是名贵的热带切花, 原产哥伦比亚西南部热带雨林, 现在非洲、欧洲和亚洲均有广泛栽培^[1]。随着红掌生产规模的不断扩大, 由细菌引起的叶枯病在美国、荷兰、意大利、菲律宾等地相继发生, 已逐渐成为红掌生长发展的制约因素。1960 年该病害在巴西红掌上发生, 随后相继在夏威夷、佛罗里达和加利福尼亚等地发现^[2]; 2000 年后该病害在我国大陆地区逐年发生, 并在夏秋季节出现局部地区爆发的现象, 对正在发展的红掌种植业造成了严重的影响。现有研究表明, 红掌细菌性叶枯病致病菌有黄单胞菌(*Xanthomonas*)^[1,3-5]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[6]和欧文氏菌属(*Erwinia*)^[7]不同种或致病变种; 我国郑平报道的病原菌为杓兰欧文氏菌(*Erwinia cypripedii*)^[8], 许秀惠报道的病原菌为地毯草黄单胞菌花叶万年青致病变种(*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*)^[9]。由此可见, 在我国引起红掌细菌性叶枯病的病原菌至少有几个种或致病变种。海南是我国红掌主产区之一, 对其病害优势种群进行调查和分离, 有利于采取针对性的防控措施。笔者采用组织分离法, 从红掌病叶上分离纯化病原菌, 对纯化后的病原菌进行形态观察、生理生化特性研究等, 并结合分子生物学手段对病原菌进行鉴定, 旨在了解海南红掌产业病害优势小种, 并为开展红掌抗病育种提供资源。

1 材料与方法

1.1 材料 参试的 3 个红掌主栽品种为‘大哥大’、‘骄阳’以及‘热情’, 病叶取自海南儋州中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所(简称“品资所”)苗圃。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离与纯化 采取组织分离法对病原菌进行分离。选取具有典型病斑的病叶, 用剪刀剪取病斑与健康叶片交界的区域, 大小约 1 cm × 1 cm, 先用 $\varphi = 75\%$ 的酒精进行表面消毒 15 ~ 30 s, 接着用无菌水清洗 2 ~ 3 次, 晾干后, 置于灭菌钵钵内, 加入 1 mL 的无菌水进行研磨。将研磨液收集后短暂离心, 取上清稀释 5 000 倍, 涂于改良的 PSA 培养基上(胰化蛋白胨 10 g · L⁻¹、蔗糖 10 g · L⁻¹、谷氨酸 1 g · L⁻¹、

收稿日期: 2013-11-06

基金项目: 国家自然科学基金(31060040, 31260345); 海南省重大科技专项(ZDZX2013023-02)

作者简介: 梁丽雯(1987-), 女, 广东阳江人, 海南大学农学院 2010 级硕士研究生。

通信作者: 陈银华(1976-), 教授, 安徽安庆人, 主要从事植物逆境分子生物学研究。E-mail: yhchen@hainu.edu.cn

琼脂 $11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, pH7.0), 28°C 培养, 48 h 后观察菌落特征, 挑取生长一致的黄色单菌落, 进行划线培养, 48 h 后对纯化的单菌落进行观察。

1.2.2 病原菌的致病性检测 将分离出的病原菌在 PSA 平板上划线倒置, 28°C 培养 48 h, 然后用无菌水将菌落洗下, 稀释至浓度为 $1 \times 10^{10} \cdot \text{mL}^{-1}$ 菌悬液。选取 1 年生大小的‘骄阳’品种的红掌苗, 用注射法接种幼嫩的叶片, 在叶片主脉的左侧注射 $20 \mu\text{L}$ 菌悬液, 接种 3 个点, 在右侧对应的每个孔上注射 $20 \mu\text{L}$ 无菌水作为对照。接种后用透明塑料袋套袋保湿, 然后于 30°C 温室内培养, 3~4 d 浇水 1 次, 30 d 后观察发病情况。

1.2.3 病原菌的病原学检测 采用常规鉴定方法进行细菌的病原学测定^[9-10]。测定项目包括: 病原菌的形态和各种染色反应、培养性状、生理生化特性等。

1.2.4 特定基因的分子检测 用细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒提取细菌基因组, 具体操作参照试剂盒说明书。

根据黄单胞菌属特异基因 ABC (ATP-binding cassette, ABC) transporter 序列设计引物 Xad-F: $5'-\text{ACACGGTCAAACGGTGC}-3'$, Xad-R: $5'-\text{TCTGCGATTTGGCTGGACA}-3'$ 。PCR 扩增体系为 $20 \mu\text{L}$, 内含 $1 \times$ Buffer, $250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Mg}^{2+}$, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, 引物各 0.4 pmol , 模板 DNA 100 ng , Taq 酶 $0.2 \mu\text{L}$; 反应条件为: 94°C 预变性 4 min, 94°C 变性 30 s, 46°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环, 72°C 延伸 7 min, PCR 产物用 $w = 1.5\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测, 琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒回收 PCR 产物, 进行测序分析, 根据序列分析结果确定病原菌所属种类。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离与纯化 从分离的菌株里挑选 5 个具有典型黄单胞菌属细菌外观的菌株, 分别编号为 DX1, DX2, DX3, DX4, DX5。从外观来看, 这 5 个菌株的菌落均呈黄色圆形, 表面光滑有光泽、全缘、蜡状、微隆起(见图 1)。

2.2 病原菌致病性检测 将 5 个菌株(DX1, DX2, DX3, DX4, DX5) 的菌悬液接种到红掌幼嫩、健康的叶片上, 从图 2 可知, 发病初期叶片产生水渍状黑色小点, 随后病斑扩大, 干瘪凹陷, 与周围叶片有明显的黄绿色过渡区域, 1 个月后叶片形成典型的红掌细菌性叶枯病病斑。可见分离出的 5 个菌株均有致病性。



图 1 纯化后的病原细菌

Fig. 1 The purified pathogen



图 2 接种 1 个月后发病情况

Fig. 2 Leaf phenotype one month after inoculation

2.3 病原菌的染色反应 将分离出的病原菌活化后在 PSA 斜面 28°C 培养 48 h, 然后用无菌水将菌落轻轻洗下, 制片检测。观察到的病原菌各菌株的染色形态和性状相同均为革兰氏阴性, 直杆状。鞭毛染色后通过油镜观察到的病原菌均具有单极生鞭毛, 具有黄单胞菌的一般特征(图 3)。

2.4 病原菌的生理生化测定 从表 1 可知, 病原菌为好氧菌, 能利用麦芽糖产酸但不产气, 不能利用其他糖源产酸产气, 可以产生具还原性的 H_2S , 可以液化明胶, 并使淀粉水解。

表 1 病原菌生理生化测定结果

Tab. 1 Physiological and biochemical characterization of pathogen

测定项目	菌株 DX1	菌株 DX2	菌株 DX3	菌株 DX4	菌株 DX5
Items	Isolate DX1	Isolate DX2	Isolate DX3	Isolate DX4	Isolate DX5
好氧性 Aerobic bacteria	+	+	+	+	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+
产 H ₂ S Production of H ₂ S	+	+	+	+	+
淀粉水解 Amylolysis	+	+	+	+	+
蔗糖 Sucrose	-	-	-	-	-
葡萄糖 Glucose	-	-	-	-	-
麦芽糖 Maltose	+	+	+	+	+
甘油 Glycerol	-	-	-	-	-
果糖 Fructose	-	-	-	-	-
乳糖 Lactose	-	-	-	-	-

注 “+”: 反应阳性 “-”: 反应阴性

Note: “+”Positive “-”: Negative

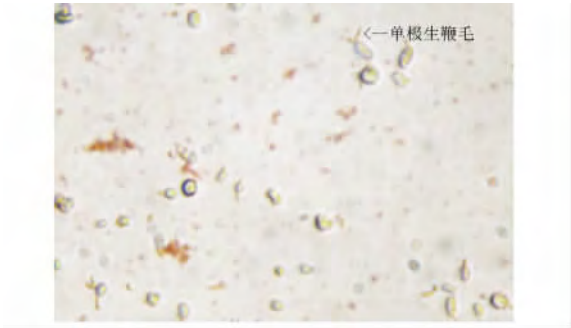


图 3 病原菌的显微观察(1 000 ×)

Fig. 3 Microscopic analysis of pathogen(1 000 ×)

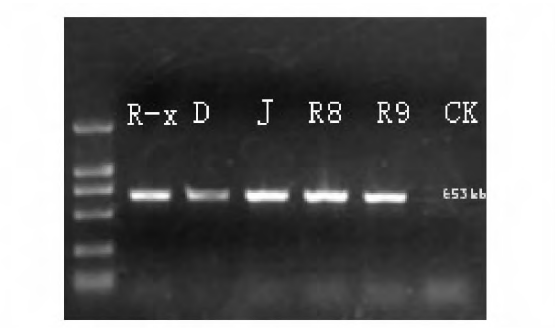


图 4 DX1, DX2, DX3, DX4, DX5 菌株基因组 PCR 扩增结果

Fig. 4 PCR amplifications of genomes of Isolates DX1, DX2, DX3, DX4 and DX5

2.5 病原菌特定序列的测定 利用特异基因 ABC 转运蛋白引物对病原菌基因组扩增, $w = 1.5\%$ 的琼脂糖凝胶检测, 得大小约为 600 bp 的扩增产物(图 4)。测序结果表明, 获得的片段大小为 653 bp, 测序结果如下:

ACATACGCATGTCGGCGAGGAACCTTCAGATCACCGCATCGTGCAGCCAATGATGCTGGGTGTTTGTCACTGG
GTCGCCCTCTGCGATGGAACCGTCATGGAGTAGTCGCCATTTCGGCAGCAATGGCAAATAGAACTCGAATTCC
GCCTCCACTGCTTGCCAGCTTTTAACTCCATCGGCGGCTGCACATGGGTATAGGTATGCTCACCAAACAACG
ACTGCCCCGAGACTGTCTTTGACGAAAAATCCGACAATCGGGCTATTCATGTCACGGTGGACCTGCGCGGAAAT
CCTCAGCAGAACATGTTACACCACCATAGAAGAAAGGCCGGGAAGGATCGTCGATGTTGGTCAACGAGACACT
TTCGATACTGGCCTCGCCTGACTTCCATCCGTCCGAATGGGCGATGTTATCGAACATCTCCAGGGTGACTTCTT
CCACGGTTTTTGATCGGAGCTCGTCCGCTGGGAGATATACTGCCTTTGATCTCCCGACGGTCCAGTGCCTGCAG
CTTTACCTCATCGCCATAACTTTCCTGGGCACAATACTCGATGTAAGCCTGGGTGGTTTCTTGAGCACTGGAGT
GCATGCGCATCACCCCTTTGTCCACAAATGTCGCAAAAA

对获得的序列进行同源性分析, 结果表明, 5 个克隆中扩增出来的片段完全一致。Blast 结果表明, 该序列与 *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachia* (登录号: DQ096647. 1) ABC 转运蛋白基因的同源性为

99%。据此将分离的病原菌鉴定为黄单胞菌花叶万年青致病变种^[1] (图 5,6)。

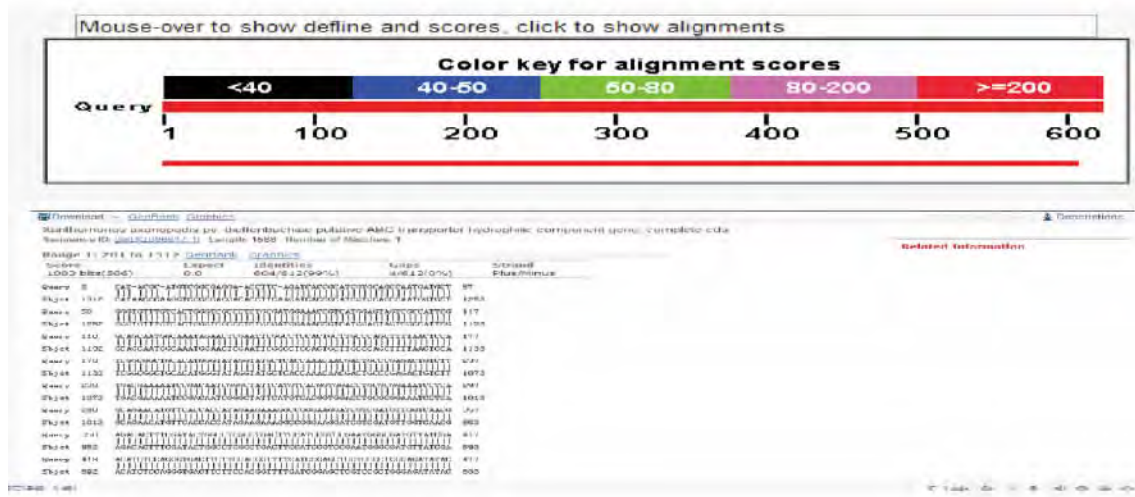


图 5 ABC 基因的同源性分析

Fig. 5 Blastn analysis of ABC transporter gene

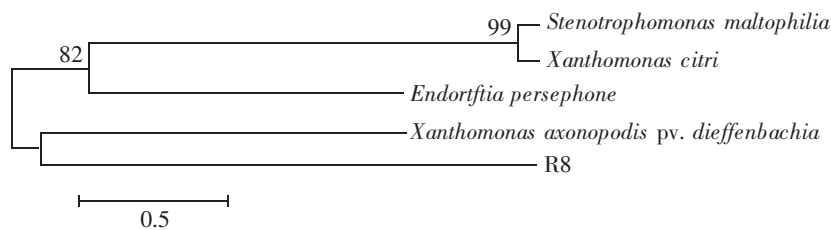


图 6 基于转运蛋白基因 ABC 进行比较得到的进化树

Fig. 6 The phylogenetic tree of ATP-binding cassette transporter gene

3 讨论

根据已有报道,红掌的致病菌有黄单胞菌^[1,4-5],假单胞菌属^[6]和欧文氏菌^[7]。海南省作为红掌主要产区之一,细菌性叶枯病严重影响了相关产业的发展。对海南红掌致病菌进行调查、研究有利于了解海南生产上该病害的主要致病小种,为开展该病的致病机理及抗病机理研究奠定基础。本实验结果表明,从“品资所”3个主栽品种的病叶上分离得到的5个菌株均能使健康的红掌致病,从其形态学特征、生理生化特性和致病性测定等方面,可以初步判定分离的这5个菌株均为黄单胞菌属,这也说明,黄单胞菌为海南红掌叶枯病的致病菌。但从形态和生化鉴定的结果很难具体确定这些菌株是地毯黄单胞菌万年青致病变种(*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, Xad)还是黄单胞菌属地毯草黄单胞菌柑橘致病变种(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)^[10],因此,进一步进行病原菌特定序列的测定是非常必要的^[8]。ABC转运蛋白家族是已知转运蛋白中最大的家族之一,广泛存在于细胞膜外膜及细胞内的各种细胞器膜上。近年来,PAGANI和RITCHIE克隆和测序了来自*X. arboricola* pv. *pruni*编码ABC转运蛋白中1个基因片段,该片段能够特异检测*X. arboricola* pv. *pruni*,且认为该基因簇可用于黄单胞菌(*Xanthomonas*)的分子鉴定^[12-13]。本研究通过扩增ABC转运蛋白特定基因,并对扩增序列进行测定和生物信息学分析,从分子水平对分离纯化的菌株进一步进行鉴定。

实验结果表明,从5个候选菌株中扩增出来的ABC转运蛋白基因序列完全一致,也进一步确定了海南生产上叶枯病的优势种群为黄单胞菌。Blastn分析结果表明,获得的基因序列与已报道的ABC转运蛋白基因序列同源性达99%,可以确定从“品资所”收集的红掌叶枯病病原菌为地毯黄单胞菌万年青变种(*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*)。

参考文献:

- [1] 刘琼光, 梁建梅, 李志伟, 等. 红掌细菌性叶枯病的病原鉴定 [J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(2): 174–177.
- [2] HAYWARD A C. A bacterial new disease of *Anthurium andraeanum* in Hawaii [J]. Plant Dis. Rep., 1972, 56: 904–908.
- [3] 杜平, 邵小斌. 我国红掌的研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2011, 39(6): 325–327.
- [4] NORMAN D J, ALVAREZ A M. A rapid method for presumptive identification of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* and other *xanthomonas* [J]. Plant Disease, 1989, 124: 215–224.
- [5] 卢梦玲, 周晓云, 曾伟达, 等. 红掌细菌性疫病病原菌的 PCR 特异性检测 [J]. 植物病理学报, 2012, 42(1): 1–9.
- [6] 许秀惠, 林俊义. 台湾红掌细菌性叶枯病及其病菌对药剂之感受性 [J]. 植物保护学会会刊, 1998, 40(4): 409–417.
- [7] 郭春雷, 蒋桂芝, 祝伟, 等. 热带植物花卉红掌叶腐病病原菌的分离与初步鉴定 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2003, 25: 32–34.
- [8] 郑平, 曾宪铭. 三种由 *Erwinia* spp. 引起的新的花卉细菌病害 [J]. 广西农业大学学报, 1995, 14(4): 294–299.
- [9] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 第8版. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组, 译. 北京: 科学出版社, 1984.
- [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, 2011.
- [11] 周翠, 孟凡志, 何邦令, 等. 红掌细菌性叶斑病的病原鉴定 [J]. 山东农业大学学报, 2012, 43(1): 25–27.
- [12] PAGANI M C, RITCHIE C F. A putative protein in *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* with similarity to the ABC transporter ATP-binding system [J]. Phytopathology, 2003, 93: S68.
- [13] LEE Y J, YAMAMOTO K, HAMAMOTO H, et al. A novel ABC transporter gene involved in multidrug susceptibility but not pathogenicity in rice blast fungus, *Magnaporthe grisea* [J]. Pesticide biochemistry and physiology, 2005, 81: 13–23.

Isolation and Characterization of Leaf Bacterial Blight Pathogen from *Anthurium andraeanum*

LIANG Liwen^{1,2}, REN Xiwang¹, GAO Zhiliang¹, FU Xiumei¹, LIN Daozhe¹, LUO Hongli¹, CHEN Yinhua^{1,2}

(1. Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Bacterial leaf blight is a destructive disease of *Anthurium* spp. This disease, caused by *Xanthomonas*, *Pseudomonas* or *Erwinia*, had a major impact on the production of *Anthurium* industry in China. Pathogens were isolated from the leaves of *Anthurium andraeanum* infected with Bacterial leaf blight at the Anthurium nursery in Hainan, China. The pathogens were purified for morphological observation, biochemical determination of pathogenic characteristics, and specific bacterial ABC transporter gene analysis. The results showed that the isolated pathogens were *Xanthomonas axonopodis*.

Key words: *Anthurium andraeanum*; leaf bacterial blight; pathogen identification; *Xanthomonas axonopodis*