

张海颖,郭凤柳,许华民,等. 河北省张北地区马铃薯疮痂病的病菌鉴定[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):131-134.

河北省张北地区马铃薯疮痂病的病菌鉴定

张海颖,郭凤柳,许华民,赵伟全,刘大群

(河北农业大学植物保护学院/河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心,河北保定 071000)

摘要:为确定河北省张北地区马铃薯疮痂病的病原,从该地区疮痂病薯病斑上分离并经温室盆栽接种,确定了 6 株病原菌株,结合菌株生物学特性和 16S rDNA 序列特征方法进行鉴定,结果表明,经 16S rDNA 序列聚类分析,菌株 ZJK-851 与 *Streptomyces scabies* 相似性为 99.65%,菌株 ZJK-855 与 *S. diastatochromogenes* 相似性为 99.15%,菌株 ZJK-854、06-D、M1-2、M1-5 与 *S. europaeiscabiei* 相似性分别为 99.73%、99.44%、99.56%、98.50%;经生物学测试发现,ZJK-851、06-D、M1-2、M1-5 不能利用阿拉伯糖、果糖、木糖为单一碳源。张北地区马铃薯疮痂病的病原至少有 3 种。

关键词:马铃薯;疮痂病;生物学特征;16S rDNA 序列;病菌鉴定

中图分类号: S435.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0131-04

张北地区是河北省马铃薯主产区,目前,马铃薯疮痂病在该地区种薯生产中发生较重,在商品薯生产过程中也时有发生,带有疮痂病的种薯会随着调运而加速该病传播。感病薯块的病斑初期表现为褐色斑点,随着薯块的膨大病斑不断扩展开裂,中央细胞木栓化,呈现略凸起或凹陷的近圆形痂状斑块,有时病斑连片形成不规则的斑块,严重时整个薯块均被侵染,病斑覆盖整个薯块。感病马铃薯由于品质下降、商品价值降低,直接给种植者造成经济损失^[1]。此外,由于块茎表皮组织被破坏,易被其他病原菌侵染,使块茎腐烂,造成更大的损失。引起马铃薯疮痂病的病原种类较多,目前国外报道的病原菌主要有 *Streptomyces scabies*、*S. acidiscabiei*、*S. aureofaciens*、*S. europaeiscabiei*、*S. luridiscabiei*、*S. niveiscabiei*、*S. puniscabiei*、*S. reticuliscabiei*、*S. stelliscabiei*、*S. turgidiscabiei*^[2-5],并且还不断有新的致病种被报道^[6-7]。我国已发现存在 *S. scabies*、*S. acidiscabiei*、*S. turgidiscabiei*、*S. galilaeus* 等疮痂病原菌,还未见对张北地区马铃薯疮痂病原菌的报道。本研究采集张北地区马铃薯疮痂病薯块,分离病原菌株,利用生物学特征和 16S rDNA 序列进行分类,以明确张北地区马铃薯疮痂病的病菌种类,为防控该病提供有力依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 样品采集 2012 年,在河北省张北地区采集马铃薯疮痂病症状明显的薯块,分装于洁净塑料袋中,带回实验室立

即进行病原菌的分离。

1.1.2 培养基 菌株分离与纯化采用燕麦琼脂培养基(OMA);测试菌株培养采用高氏 1 号培养基;液体菌丝培养采用胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)培养基。

1.1.3 主要试剂 *Taq* 酶、dNTP、*T₄* DNA Ligase、2×GC buffer II、DL2000 DNA marker、DNA 凝胶回收试剂盒、pGEM®-T Easy 载体等均为 TaKaRa 公司产品;大肠杆菌 DH 5α 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司;溶菌酶为 Sigma 公司产品;TSB、TRYPTONE 和 YEAST EXTRACT 为 Bacto 公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 菌株的分离纯化与孢悬液的制备

参照刘大群等的方法^[8],将病薯用蒸馏水洗净,用解剖刀切取约 5 mm³ 病健交界处的薯块,于 0.3% NaClO 溶液中浸泡约 30 s;取出切成 1 mm 厚的小片,置于 1.8% 琼脂培养基上 28 ℃ 培养 7 d;挑取单菌落划线于含 1 mg/L Penicillin G 的 OMA 培养基进行纯化,连续纯化 3 次后,即得纯链霉菌菌株。

挑取生长 6 d 的单菌落孢子,涂布于高氏 1 号培养基上培养 10 d,用无菌水洗下孢子倒入离心管中,置于涡旋振荡器上振荡 1 min;经装有脱脂棉的注射器过滤后,转移至离心管中 4 ℃ 10 000 g 离心 15 min,弃上清,加入无菌 20% 甘油,充分混匀后 -20 ℃ 保存。

1.3 菌株致病性检测

选用健康的马铃薯品种 Favorita 薯块,用清水洗净,表面用 75% 乙醇消毒,置于 28 ℃ 光照培养箱中催芽;待芽长约 1 cm 时取出切块,每块留 1 个芽眼;待薯块切口愈合后,播种至蛭石和土壤以 1:1 比例混配、直径约 15 cm 的花盆中,待薯苗高约 10 cm 时,选取长势一致的植株进行接种试验。将高氏 1 号培养基上生长 10 d 的待测菌株孢子用无菌水洗下,调整孢子悬浮液浓度至 10⁶ CFU/mL,采用灌根法接种,接种量为每盆 200 mL,设清水处理对照。每处理重复 3 次,待马铃薯收获后检测疮痂病发病情况。

1.4 病原菌生物学特性测定

菌株碳源、氮源利用及敏感性测试等参照 Lambert 等的

收稿日期:2013-12-19

基金项目:国家自然科学基金(编号:30700523);河北省高层次人才项目(编号:20120346);现代农业产业技术体系建设专项资金(编号:CARS-10-P12)。

作者简介:张海颖(1987—),女,山西吕梁人,硕士,从事植物病害生物防治研究。E-mail: taiyuanshiyuan0000@163.com。

通信作者:赵伟全,博士,教授,主要从事植物病害生物防治与分子植物病理学研究, E-mail: zhaowquan@126.com;刘大群,博士,主要从事植物病害生物防治与分子植物病理学研究。E-mail: ldq@hebau.edu.cn。

方法^[9-10],其他鉴定指标测定参照文献[11]进行。

1.5 病原菌 16S rDNA 序列分析

各菌株菌丝培养和基因组的提取参照《Practical Streptomyces Genetics》中的方法^[12]进行,并置于 -20 ℃ 冰箱中保存待用。

1.5.1 16S rDNA 序列扩增和测序 根据 NCBI GenBank 已报道的链霉菌 16S rDNA 序列设计引物,由华大基因科技有限公司进行合成,引物序列为 P(u): 5' - CATTACG-GAGAGTTTGATCC - 3', P(d): 5' - AGAAAGGAGGTGATC-CAGCC - 3'。PCR 扩增体系为: ddH₂O 20.2 μL, 2 × GC buffer II 25 μL, 10 mmol/L dNTP 1 μL, 引物 P(u) 1 μL, 引物 P(d) 1 μL, DNA 模板 1 μL, Taq DNA 聚合酶 0.8 μL, 总体积为 50 μL。PCR 扩增程序: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 62 ℃ 退火 50 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 5 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,利用 DNA 凝胶

回收试剂盒回收,扩增产物与 pGM-T 载体连接后转入大肠杆菌 DH 5α,挑取阳性克隆送交华大基因进行测序。

1.5.2 系统发育树的构建 对测试菌株 16S rDNA 序列校对,在 GenBank 中进行 Blast 比对,选取同源性较高的登记菌株 16S rDNA 序列作为参比序列,利用 MEGA 5.0 软件进行多重序列比对,构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 菌株致病性验证

采集的病薯经分离纯化后,共获得 6 株链霉菌菌株。温室盆栽接种试验结果表明,所得 6 个菌株均能使马铃薯新生薯块产生褐色坏死,其中, ZJK-851、ZJK-855 菌株的病斑最为典型,呈现略凸起的较大痂状病斑, ZJK-854、06-D、M1-2、M1-5 菌株造成的病斑相对较小(图 1)。



1—ZJK-851; 2—ZJK-854; 3—ZJK-855; 4—06-D; 5—M1-2; 6—M1-5

图1 温室盆栽试验马铃薯疮痂病的致病情况

2.2 菌株生物学特征

6 个测试菌株在高氏 1 号培养基上形态特征由表 1 可见: 6 株菌株的孢子丝呈螺旋状; 菌株 ZJK-851、ZJK-854、06-D、M1-2、M1-5 孢子呈灰色, 菌株 ZJK-855 孢子为灰白色。ZJK-854、06-D、M1-2、M1-5 产生褐色可溶性色素, ZJK-851、ZJK-855 产生黄色可溶性色素。

6 个菌株生理生化特征测试结果表明(表 1): ZJK-851、06-D、M1-2、M1-5 不能以阿拉伯糖、木糖、果糖为单一碳源, 只有 ZJK-855 能以阿拉伯糖、木糖、果糖为单一碳源; 在被测的甲硫氨酸、羟脯氨酸和组氨酸中, 6 种菌株均能以这 3 种氨基酸作为单一氮源; 在敏感性测试中, 6 个菌株对 20 μg/mL 链霉素和 0.5 μg/mL 结晶紫均敏感, 对 10 IU/mL 青霉素都不敏感, ZJK-855 对 0.1% 苯酚不敏感, 其余 5 种菌株对苯酚均敏感; 6 种菌株在 pH 值为 5.0 时能生长; ZJK-855 不产生黑色素, 其余 5 种菌株均产生黑色素, 6 种菌都不产生可溶性色素。

2.3 16S rDNA 扩增及系统发育树构建

采用《链霉菌操作手册》中的方法提取各菌株的基因组 DNA, 利用 P(u) 和 P(d) 引物对菌株基因组进行扩增, 均能扩出约 1.5 kb 的目的片段(图 2)。将条带分别回收、纯化, 交由华大基因测序, 序列经校对, 在 NCBI 的 GenBank 数据库中进行 Blast 分析, 结果表明, 6 个菌株测得的序列均为链霉菌 16S rDNA 序列。选取与测试菌株序列相似性较高的菌株作为参比菌株构建系统发育树, 选取的参比菌株为 *S. acidiscabies* (AY621376)、*S. bobili* (NR_041121)、*S. europaeiscabiei* (NR_042790)、*S. galilaeus* (NR_040857)、*S. griseus* (NR_074787)、*S. scabiei* ATCC49173 (D63862)、*S. setonii* (D63872)、*S. turgidiscabies* (NR_040828)、*S. diastatochromogenes* ATCC12309 (AB026218)、*S. lividans* TK24、*S. albulus* (AB024443)、*S. galbus* (NR_026178)、*S. chartreuses* (NR_041216)、*S. virginiae* (JN201950)。利用 MEGA 5.0 软件对所有菌株的 16S rDNA 序列进行聚类分析, 采用邻接法 (Neighbor -

表 1 6 个菌株的生理生化特性

菌株	生物学特征		碳源利用								
	孢子链形态	孢子堆颜色	阿拉伯糖	棉籽糖	甘露醇	木糖	果糖	鼠李糖	葡萄糖	蔗糖	肌醇
ZJK-851	S	G	-	+	+	-	-	+	+	+	+
ZJK-854	S	G	-	+	+	+	+	+	+	+	+
ZJK-855	S	GW	+	+	+	+	+	+	+	+	+
06-D	S	G	-	+	+	-	-	+	+	+	+
M1-2	S	G	-	+	+	-	-	+	+	+	+
M1-5	S	G	-	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>S. scabies</i>	S	G	-	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>S. galilaeus</i>	S	G	-	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>S. acidiscabies</i>	Rf	W	-	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>S. turgidiscabies</i>	Rf	W	-	+	-	-	-	-	+	+	+

菌株	氮源利用			敏感性测定						
	甲硫氨酸	羟脯氨酸	组氨酸	10 IU/mL 青霉素	0.1% 苯酚	20 μg/mL 链霉素	0.5 μg/mL 结晶紫	最低生长 pH 值	可溶性色素	黑色素产生
JK-851	+	+	+	+	-	-	-	5	-	+
ZJK-854	+	+	+	+	-	-	-	5	-	+
ZJK-855	+	+	+	+	+	-	-	5	-	-
06-D	+	+	+	+	-	-	-	5	-	+
M1-2	+	+	+	+	-	-	-	5	-	+
M1-5	+	+	+	+	-	-	-	5	-	+
<i>S. scabies</i>	+	+	+	+	-	-	-	5	-	+
<i>S. galilaeus</i>	+	+	+	+	-	-	-	5	-	-
<i>S. acidiscabies</i>	+	+	+	+	-	-	-	4	Y	-
<i>S. turgidiscabies</i>	-	+	+	+	-	-	-	5.5	-	-

注：+：产生或能生长，-：不产生或不能生长；S：螺旋状；Rf：直-柔曲状；G：灰色；W：白色；Y：黄色。

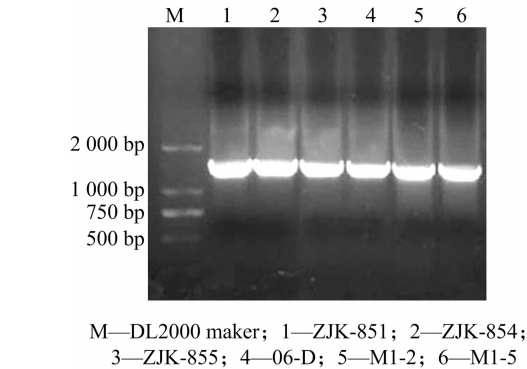


图2 菌株 16S rDNA 的 PCR 扩增结果

Joining) 构建系统发育树,结果显示,菌株 ZJK-851 与 *S. scabies* ATCC 49173 最为相近,相似性为 99.65%;菌株 ZJK-855 与 *S. diastatochromogenes* 较为相近,相似性为 99.15%;菌株 ZJK-854、06-D、M1-2、M1-5 聚为 1 支,与 *S. europaeiscabiei* 亲缘关系最近,相似性分别为 99.73%、99.44%、99.56%、98.50% (图 3)。

3 讨论

马铃薯疮痂病为土传病害,是近年来马铃薯生产上发生和蔓延较快的病害之一,主要通过土壤和种薯在马铃薯种薯运输过程中传播至新的地区。目前,马铃薯种薯流通主要受市场经济调节,流向无明显规律,这是疮痂病分布复杂的原因之一。另外,目前世界上已知疮痂病可由 10 多种植物病原链霉菌引起,造成的症状复杂多样^[13],这也是导致该病害复杂

的原因。我国马铃薯疮痂病菌的组成也较为多样,存在 *S. scabies*、*S. galilaeus*、*S. bobili*、*S. turgidiscabies*、*S. acidiscabies* 等多种病原菌^[2,9]。康蓉等曾对甘肃马铃薯疮痂病原进行鉴定,发现甘肃省马铃薯疮痂病的病原有 *S. scabies* 和 *S. griseus*^[14]。因此,只有明确当地疮痂病原菌的种类和组成,才能有针对性地采取防控措施。

在病原菌鉴定过程中,各生物学性状可能会出现少量指标与文献报道不一致,因此,应选择尽可能多的生物学测试指标进行系统分析。目前,核酸数据库中细菌 16S rDNA 序列的数据信息日益完善,已成为细菌鉴定的重要参考依据。链霉菌在鉴定时,16S rDNA 序列是非常有力的依据,根据 16S rDNA 序列就能将菌株进行初步鉴定。本研究结合各菌株的生物学特征和 16S rDNA 序列特点,对河北省张北地区的 6 株疮痂病原菌进行鉴定,发现利用 16S rDNA 序列可与 *S. scabies*、*S. europaeiscabiei* 和 *S. diastatochromogenes* 分别聚类,说明张北地区的马铃薯疮痂病菌至少有 3 种。在生理生化测定中,菌株 ZJK-851、06-D、M1-2、M1-5 不能利用阿拉伯糖、果糖、木糖,与国际已报道的 *S. scabies*、*S. europaeiscabiei* 能利用这 3 种糖结果不一致,但是与中国参照菌株 *S. scabies* 结果相一致;菌株 ZJK-855 与 *S. diastatochromogenes* 不能利用木糖、阿拉伯糖的研究结果不一致,其原因可能与菌株地区适应性和自身特性有关。

本研究分析的病原菌数量有限,所得结果只能作为该地区病原的初步结论,将继续对张北地区进行全面调查,获得更多菌株进行系统分析鉴定,为该地区马铃薯疮痂病的防治提供准确信息。

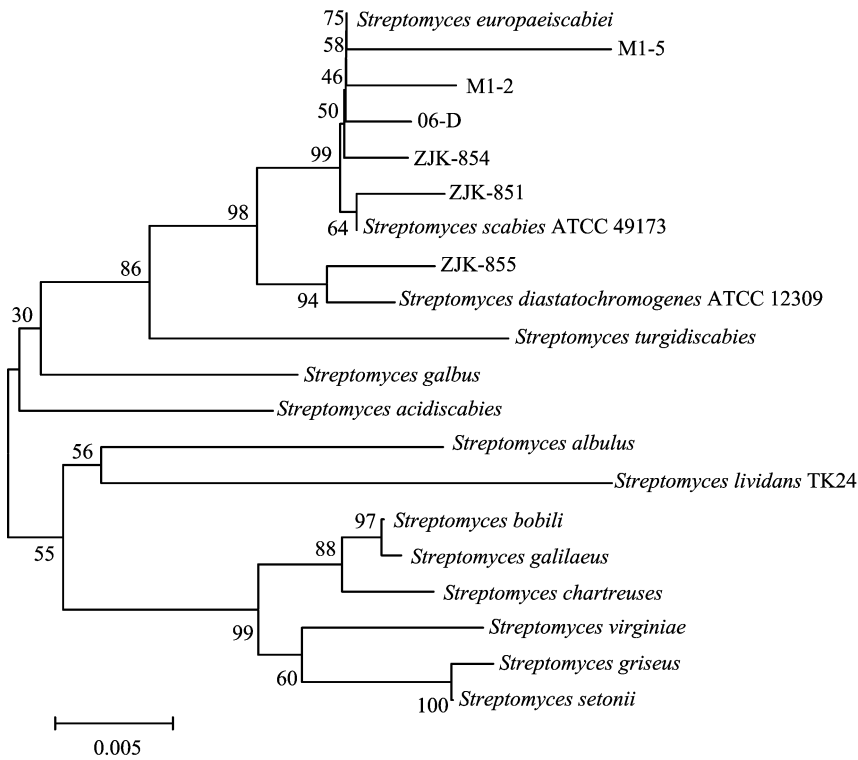


图3 根据测试菌株 16S rDNA 序列构建的系统发育树

参考文献:

[1] 赵伟全, 杨文香, 李亚宁, 等. 中国马铃薯疮痂病菌的鉴定[J]. 中国农业科学, 2006, 39(2): 313-318.

[2] Loria R, Bukhalid R A, Fry B A, et al. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*[J]. Plant Disease, 1997, 81(8): 836-846.

[3] Wanner L A. A survey of genetic variation in *Streptomyces* isolates causing potato common scab in the United States[J]. Phytopathology, 2006, 96(12): 1363-1371.

[4] Park D H, Yu Y M, Kim J S, et al. Characterization of *Streptomyces* causing potato common scab in Korea[J]. Plant Disease, 2003, 87(11): 1290-1296.

[5] Kreuze J F, Suomalainen S, Paulin L, et al. Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and PCR analysis of the *nec1* gene from *Streptomyces* spp. causing common scab, pitted scab, and netted scab in Finland[J]. Phytopathology, 1999, 89(6): 462-469.

[6] Groth I, Schütze B, Boettcher T, et al. *Kitasatospora putterlickiae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil, transfer of *Streptomyces kifunensis* to the genus *Kitasatospora* as *Kitasatospora kifunensis* comb. nov., and emended description of *Streptomyces aureofaciens* Duggar 1948[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(Pt 6): 2033-2040.

[7] Wanner L A. A new strain of *Streptomyces* causing common scab in potato[J]. Plant Disease, 2007, 91(4): 352-359.

[8] Liu D Q. Biological control of *Streptomyces scabies* and other plant pathogens[D]. Minnesota: University of Minnesota, 1992.

[9] Lambert D H, Loria R. *Streptomyces scabies* sp. Nov., nom. Rev[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1989, 39(4): 387-392.

[10] Miyajima K, Tanaka F, Takeuchi T, et al. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48(2): 495-502.

[11] 中国科学院微生物研究所伯杰细菌鉴定手册翻译组. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984.

[12] Kieser T, Bibb M J, Buttner M J, et al. Practical *Streptomyces* genetics[M]. England: John Innes Foundation, 2000.

[13] Loria R, Kers J, Joshi M. Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*[J]. Annual Review of Phytopathology, 2006, 44: 469-487.

[14] 康蓉, 王生荣. 甘肃马铃薯疮痂病原初步鉴定[J]. 植物保护, 2013, 39(3): 78-82.