

文章编号: 1001- 4829(2009) 06- 1616- 03

柑桔溃疡病菌致病性研究初探

姚廷山, 周彦, 李中安, 唐科志, 杨方云, 肖田, 胡军华, 周常勇*

(中国农业科学院柑桔研究所 国家柑桔工程技术研究中心, 重庆 400712)

摘要: 从四川、湖北两省收集的柑桔病样分离出 2 个溃疡病菌株, 经生物学和 PCR 鉴定后, 分别针刺接种于纽荷尔脐橙、福本脐橙、卡拉卡拉脐橙和春见桔橙等 4 个柑桔品种; 接种 2 d 后调查发病情况, 使用 DPS 软件 8. 01 的 Duncan 新复极差法进行分析。结果表明, 接种后 4 d 是最佳观察时期, 4 个柑桔品种分别接种上述菌株后发病率无明显差异, 老叶和成叶的发病率要高于嫩叶的发病率, 叶片不同部位之间的发病率也基本相当, 桔橙的抗病性要高于脐橙的抗病性。
关键词: 柑桔溃疡病菌; 鉴定; 离体叶; 接种; 致病性
中图分类号: S436. 661. 19 **文献标识码:** A

Preliminary Study on Pathogenicity of
Xanthomonas axonopodis pv. *Citri*

YAO Ting-shan, ZHOU Yan, LI Zhong-an, TANG Ke-zhi, YANG Fang-yun, XIAO Tian, HU Jun-hua, ZHOU Chang-yong*
(Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, National Engineering Research Center for Citrus, Chongqing 400712, China)

Abstract Two citrus canker strains were isolated from the samples collected from Sichuan and Hubei provinces. After identification by PCR, the two strains were vaccinated in 4 citrus varieties such as new hall navel orange, fukumoto navel orange, cara cara navel orange and kiyomi tangor by acupuncture. Two days' later, the incidence was investigated. After analysis by DPS software 8. 01 Duncan LSR method, the results showed that 4 days after inoculation was the best period for observation. There were no significant difference among the 4 citrus varieties after inoculation, no difference were found out in a same leaf, either. Disease ratio in old leaves and young leaves were higher than that in tender leaves. Disease resistant of hybrid of mandarin orange was superior to the resistance of navel orange.
Key words Citrus bacterial canker strain; Identification; Excised leaf; Inoculation; Pathogenicity

柑桔溃疡病是一种为害全球柑桔产业的重大检疫性病害, 其病原菌为地毯草黄单胞柑桔致病变种 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, Xac)。我国的柑桔溃疡病主要分布在广东、广西、江西、福建、浙江、湖南、云南、贵州等南方柑桔种植省(区)发生较普遍, 在四川、湖北、重庆等省(市)有局部零星分布。该病引起落叶落果、果实生斑, 导致商品性能降低, 严重影响出口^[1~2]。该病检验检疫方法较多, 据 Civerolo 等报道, 对柑桔溃疡病菌的最终鉴定, 必须

以其在人工接种的感病寄主上产生典型症状的致病性试验结果为依据^[3]。离体叶接种法简单易行, 对防止柑桔溃疡病菌扩散的控制作用很强, 本试验探寻了适合离体叶接种法的柑桔品种、叶龄及接种部位, 同时比较菌株的致病性分化, 为柑桔溃疡病流行规律研究奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

分别从四川、湖北两省疫区发病的柑桔叶片上分离获得两菌株, 编号为 CSC (四川) 和 CHB (湖北)。纯化后, LB 培养基上 28 ℃ 培养 72 h 备用^[4]。

1.2 菌种鉴定

采用 SDS 法抽提菌株基因组 DNA^[5], 应用 PCR 检测柑桔溃疡病, 序列为 5' TTGGTGTCTCGTCGTTG-

收稿日期: 2009- 03- 11
基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2007BAD47B03); 重庆市重大科技专项 (CSTC, 2007AA 1024); 2009 年农作物病虫害疫情监测与项目资助
作者简介: 姚廷山 (1980-), 男, 助理研究员, 主要从事植物保护的研究, E-mail yts103x@126.com, * 为通讯作者: E-mail changyong@hotmail.com

TAT 3' 和 5' CACGGGTGCAAAAAATCT 3', 琼脂糖电泳分析^[6]。同时, 将纯培养的菌株 CSC、CHB 菌株接种卡拉卡拉脐橙叶片, 调查发病情况。

1.3 供试寄主

从福本脐橙、卡拉卡拉脐橙、纽荷尔脐橙和春见桔橙上分别采集嫩叶 (新抽发且叶片有褶皱, 未伸展)、成熟展平叶 (新抽发已长至展平叶, 未变成老叶的深绿色) 和老叶 (叶片已变成深绿色)。样品均采自中国农业科学院柑桔研究所果园。

1.4 接种与调查方法

叶片用灭菌水洗净后, 置于 90 mm 培养皿底部用双层滤纸保湿, 柑桔叶片的基部用脱脂棉保湿。将菌液配成 10⁷ cfu/mL, 叶片用针刺接种^[7], 每叶分叶稍部和叶基部两个部位各针刺 3 针, 针刺处用灭菌的小滤纸片蘸菌接种并用无菌水保湿^[8], 24 h 后去除小滤纸片, 叶片不同品种、不同叶龄及接种不同菌株各个处理皆设置 3 张叶片, 每处理 3 次重复。接种后置于 28℃ 培养, 2 d 后观察接种处发病情况。

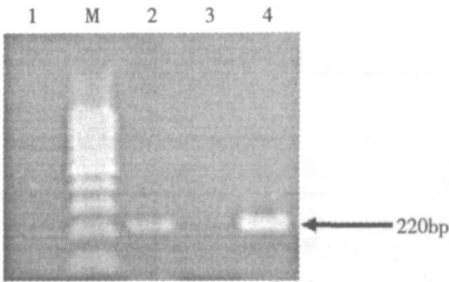
2 结果与分析

2.1 菌株鉴定结果

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 菌株 CSC、CHB 和阳性样品均可产生约 220 bp 的特征性条带, 清水对照和阴性对照未产生特征性条带 (图 1); 体外接种试验结果表明, 卡拉卡拉脐橙产生明显的溃疡病病斑; 证明从两地分离纯化的菌株均为柑桔溃疡病菌。

2.2 发病情况调查

菌株 CSC、CHB 接种叶片后, 3 d 左右开始发病, 在接种 4 d 时, 发病率高。在福本脐橙、卡拉卡拉脐橙、纽荷尔脐橙和春见桔橙的 3 种叶龄叶片上, 溃疡病症状明显, 而随着调查时间的延长, 针刺接种的新叶越容易萎蔫变褐及滋生腐生菌, 所以 4 d 为发病率最佳的调查时期。



1 灭菌水对照; M: 1Kb DNA Marker 2 CHB 菌株; 3 阴性对照; 4 CSC 菌株
Lane 1: ddH₂O control; M: 1 Kb DNA Marker Lane 2: CHB strain
Lane 3: negative control Lane 4: CSC strain

图 1 PCR 扩增图谱

Fig 1 The diagram of PCR amplification

2.3 致病性分析

2.3.1 不同柑桔品种对致病性影响 用 DPS 软件 8.01 对不同叶龄分别接种不同菌株的 4 个品种之间的发病率进行差异显著性分析, 结果表明, 菌株 CSC 接种福本脐橙、卡拉卡拉脐橙、纽荷尔脐橙和春见桔橙叶片后, 老叶发病率差异不显著; 4 个柑桔品种的成叶发病率以春见桔橙最低; 纽荷尔脐橙和卡拉卡拉脐橙的嫩叶发病率极显著高于春见桔橙, 而与福本脐橙差异不显著性, 春见与福本脐橙也无显著差异 (表 1)。

CHB 菌株对 4 个柑桔品种的老叶和成叶均无显著性差异, 在嫩叶上, 红肉脐橙极显著高于其他 3 个品种, 而 3 个品种之间无显著性差异 (表 1)。

2.3.2 不同叶龄对致病性影响 用 DPS 软件 8.01 对不同柑桔品种分别接种不同菌株的 3 个叶龄之间的发病率进行差异显著性分析, 结果表明, 菌株 CSC 接种纽荷尔脐橙和卡拉卡拉脐橙的不同叶龄叶片, 发病率无差异显著性, 接种福本脐橙, 老叶和成叶发病率显著高于嫩叶。接种春见桔橙, 老叶的发病率显著高于成叶, 极显著高于嫩叶, 成熟展平叶显著高于嫩叶 (表 2)。

表 1 2 个菌株对 4 个柑桔品种的致病差异性比较

Table 1 Difference in pathogenicity of two strains among four citrus various cultivars

	四川菌株 CSC Strain from Sichuan			湖北菌株 CHB Strain from Hubei		
	老叶 Old leaves	成熟展平叶 New mature leaves	嫩叶 Infantile leaves	老叶 Old leaves	成熟展平叶 New mature leaves	嫩叶 Infantile leaves
纽荷尔脐橙	99.99aA	95.58aA	92.96aA	84.45aA	74.71aA	4.42bB
福本脐橙	99.99aA	99.99aA	35.69abAB	74.71aA	74.71aA	7.04bB
卡拉卡拉脐橙	99.99aA	99.99aA	84.45aA	99.99aA	99.99aA	99.99aA
杂柑春见	92.96aA	38.77bB	0.01bB	99.99aA	32.55aA	7.04bB

注: 不同小写字母表示差异显著; 不同大写字母表示差异极显著, 下同。
Note: Different small letters in the same column indicate significant difference; different capital letters indicate fearfully significant difference. The same as below.

表 2 2菌株对不同叶龄致病差异

Table 2 Difference in pathogenicity of two strains among citrus leaves with various ages

	四川菌株 CSC Strain from Sichuan				湖北菌株 CHB Strain from Hubei			
	纽荷尔 Newhall	福本 Fukumoto	卡拉卡拉 Caracara	春见 Kiwami	纽荷尔 Newhall	福本 Fukumoto	卡拉卡拉 Caracara	春见 Kiwami
老叶	99.99aA	99.99aA	99.99aA	92.96aA	84.45aA	74.71aA	99.99aA	99.99aA
成熟展平叶	95.58aA	99.99aA	99.99aA	38.77bAB	74.71aA	74.71aA	99.99aA	32.55bB
嫩叶	92.96aA	35.69bA	84.45aA	0.01cB	4.42aA	7.03aA	99.99aA	7.04bB

菌株 CHB 接种福本脐橙、卡拉卡拉脐橙、纽荷尔脐橙的不同叶龄叶片,发病率皆无显著差异,接种春见桔橙,老叶极显著高于成叶和嫩叶,成叶和嫩叶之间不存在显著性差异(表 2)。

2.3.3 菌株 CSC、CHB 致病性比较 从叶片发病情况来比较两菌株的致病性差异,菌株 CSC、CHB 对各品种及各叶龄的发病率互有优劣。对于 CSC 菌株,除卡拉卡拉脐橙嫩叶(77.77% < 100%)、春见桔橙老叶(83.88% < 100%)、春见桔橙嫩叶(0 < 16.67%)的发病率比 CHB 菌株低外,其它的发病率都比 CHB 菌株稍高或相同,可见,纽荷尔脐橙与福本脐橙对 CSC 菌株较敏感,而卡拉卡拉脐橙与春见桔橙对 CHB 菌株较敏感。从致病性上来看,两菌株出现菌系分化的可能性较小^[9]。

2.3.4 不同接种部位比较 试验中,从靠近叶稍部和靠近叶基部的针刺接种的发病率来看,用 DPS 软件 8.01 分析发病率差异不显著,说明接种部位的选择对两菌株针刺接种离体叶片的发病率基本无影响。

3 结论与讨论

从体外接种试验结果可以看出,3 个脐橙品种的抗病性低于春见桔橙,这与前人所报道的田间品种抗病性的结果相一致^[10],而卡拉卡拉脐橙的感病性相对于其它两个品种稍强。各品种老叶和成叶的发病率要高于嫩叶,并且老叶和成叶在保湿的条件下,保存时间也要高于嫩叶。菌株 CSC、CHB 接种

叶片的不同部位,发病率也基本一致。因此,在选用体外接种方法做溃疡病研究的时候,应选用老叶或成叶作为实验材料,叶片接种部位的选择对结果基本无影响,选择福本脐橙或纽荷尔脐橙较适合。CSC、CHB 两菌株的叶片接种发病率基本无差异,说明这两种菌株的致病性差异不大,推断菌系分化的可能性较小,还需要通过进一步的分子生物学鉴定来证明。

参考文献:

[1] 方毅敏, 张宜绪. 柑桔溃疡病综合防治研究 [J]. 植物保护学报, 1992, 19(2): 101- 105

[2] 袁承东. 柑桔溃疡病在国内外危害防治及研究综述 [J]. 植物检疫, 1993, 7(5): 36- 37

[3] Civerolo E L. 世界柑桔溃疡病及其病原菌的研究现状和进展 [J]. 王中康译. 植物检疫, 1990, 4(2): 115- 120

[4] 吴文川, 洪敏霓, 王丽媛, 等. 适合柑桔溃疡病菌生长的一种固体培养基 [J]. 植物保护学会会刊, 1986, 28(2): 225- 228

[5] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1999

[6] 唐科志, 周常勇, 王雪峰, 等. 应用 PCR 技术快速检测柑桔溃疡病的研究 [J]. 中国南方果树, 2005, 34(2): 1- 4

[7] 方中达. 植病研究方法 (第三版) [M]. 北京: 中国农业出版社, 1982

[8] 李云锋, 李 祥. 柑桔溃疡病菌离体叶接种检验法的研究 [J]. 华中农业大学学报, 2000, 19(5): 421- 423

[9] 任建国, 黄思良, 李杨瑞, 等. 广西柑橘溃疡病菌菌系分化研究 [J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 216- 220

[10] 张戈璧, 阳廷密, 李喜庆. 不同柑桔品种对柑桔溃疡病抗病能力的测定 [J]. 植物保护学报, 2004, 31(2): 221- 222

(责任编辑 李正华)