

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672—3635(2022)06—0537—07
DOI: 10.19918/j.cnki.1672-3635.2022.06.007

病虫害防治

首次于青海省发现 *Pectobacterium polaris* 引起马铃薯黑胫病

刘思邈¹, 孙清华¹, 张凤军², 马永强², 冯志文¹, 张若芳^{1*}

(1. 内蒙古大学马铃薯工程技术研究中心, 内蒙古 呼和浩特 010021; 2. 青海大学农林科学院, 青海 西宁 810016)

摘要: 青海省位于青藏高原和黄土高原的交汇处, 具有地理位置海拔较高、日照充足、气候冷凉、昼夜温差大优势, 适宜马铃薯的生长。随着马铃薯生产规模的不断扩大, 黑胫病的发生逐步蔓延。2021年秋季, 在青海省马铃薯产区, 发现了疑似马铃薯黑胫病的植株。将样品清洗消毒后, 对疑似病症部位病原菌进行分离与纯化, 以获得单一菌落的纯净菌株, 提取菌株DNA, 采用细菌16S rRNA基因扩增的通用引物对待测菌株进行扩增, PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 将质量良好的PCR产物进行Sanger测序, 所获得序列与GenBank数据库中已知序列进行Blast比对, 并通过MEGAX构建系统发育树, 同时, 在薯块和马铃薯植株中进行致病性检测。结果显示, 分离出的3株菌株满足科赫法则, 且序列比对结果与已报道的 *Pectobacterium polaris* 菌株同源性高, 并基于16S rRNA以及多位点序列分析构建系统发育树, 均与 *Pectobacterium polaris* 高度相似。因此, 这3株分离物属于 *Pectobacterium polaris* 菌株, 是中国青海省首次报道。

关键词: *Pectobacterium polaris*; 马铃薯黑胫病; 病原菌; 序列分析; 系统发育树

First Report of *Pectobacterium polaris* Causing Blackleg on Potato in Qinghai Province

LIU Simiao¹, SUN Qinghua¹, ZHANG Fengjun², MA Yongqiang², FENG Zhiwen¹, ZHANG Ruofang^{1*}

(1. Potato Engineering and Technology Research Center, Inner Mongolia University, Hohhot, Inner Mongolia 010021, China;
2. Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China)

Abstract: Qinghai Province is located at the confluence of the Qinghai-Tibet Plateau and the Loess Plateau. It has the advantages of high altitude, abundant sunshine, cool climate and large day-night temperature difference, which is suitable for potato growth. With the continuous expansion of potato production scale, the occurrence of blackleg gradually spreads. In autumn 2021, plants suspected of potato blackleg were found in potato producing areas in Qinghai Province. After the samples were cleaned and disinfected, the pathogenic bacteria in the suspected disease site were isolated and purified to obtain a pure strain of a single colony. The DNA of the strain was extracted and amplified by the universal primer of bacterial 16S rRNA gene. The PCR products were detected by agarose gel electrophoresis. The PCR products with good quality were subjected to Sanger sequencing, and the sequences obtained were Blast compared with the known sequences in the GenBank database. The phylogenetic tree was constructed by MEGAX.

收稿日期: 2022-11-21

基金项目: 国家马铃薯产业技术体系(CARS-09-P17); 内蒙古自治区高等学校学科研究项目(NJZY21289)。

作者简介: 刘思邈(1999-), 硕士研究生, 研究方向为生物学(分子遗传学)。

*通信作者(Corresponding author): 张若芳, 教授, 研究方向为植物病理, E-mail: ruofangzhang@163.com。

Meanwhile, the pathogenicity was detected in potato tubers and plants. The results showed that the three isolates satisfied Koch's rule, and the sequence alignment results showed high homology with the reported *Pectobacterium polaris* strains. The phylogenetic trees were constructed based on 16S rRNA and multi-locus sequence analysis, indicating that the three isolates were highly similar to *Pectobacterium polaris* strains. Therefore, these three isolates belong to *Pectobacterium polaris*, which is reported for the first time in Qinghai Province, China.

Key Words: *Pectobacterium polaris*; potato blackleg; pathogen; sequence analysis; system development tree

马铃薯原产于南美洲安第斯山高山区, 由于其块茎具有较高的营养价值, 是仅次于水稻和小麦的全球第三大粮食作物^[1]。在中国马铃薯种植范围较为广泛, 覆盖了东北、华北、西北、西南和华南各地区, 种植面积达 4.67×10^6 hm²左右。但随之而来的是马铃薯病虫害对其产量的影响日益突出, 其中黑胫病为生产上广泛发生的病害之一, 发病严重时田间发病率可达50%以上, 严重降低了马铃薯的产量和品质, 使种植户遭受巨大经济损失。

马铃薯黑胫病是一种细菌性病害, 一般是种薯带菌开始腐烂, 传至地下茎, 地下茎腐烂后传至地上茎基部, 维管束病变部位呈现黑褐色, 植物叶片开始萎蔫, 茎基部撕裂折断; 后期病菌通过匍匐茎传入到新的块茎中, 导致新生块茎腐烂。马铃薯黑胫病病原菌属于果胶杆菌属(*Pectobacterium* spp.)和狄克氏菌属(*Dickeya* spp.), 果胶杆菌科(*Pectobacteriaceae*), 变形菌门(*Proteobacteria*)^[2], 其宿主范围广泛, 包括马铃薯在内的其他蔬菜作物以及观赏植物^[3]。其中果胶杆菌属和狄克氏菌属分布尤为广泛, 已报道可以侵染39个科的86种不同植物^[4]。在中国, 马铃薯黑胫病主要致病菌为果胶杆菌属病原菌。该病原菌分布广泛, 在不同区域病原群体结构特征可能存在差异。本研究从青海省马铃薯产区病样组织中分离致病菌, 通过16S rRNA序列、多位点序列分析以及致病性进行病原菌的鉴定, 比较分析不同菌株的致病力, 期望了解不同区域的主要病原菌种类, 为制定有针对性的黑胫病有效防控措施提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 分离和纯化

2021年9月, 在青海省西宁市(E 101.74°, N 36.56°)

马铃薯产区(调查面积为30 hm²)发现疑似黑胫病感染植株(图1), 发病率为20%左右。从该产区采集到‘Favorita’疑似病株5株, 分离得到*Pectobacterium* spp. 3株, 命名为ZRIMU1222、ZRIMU1223和ZRIMU1224。将样品进行分离病原菌, 首先将受黑胫病感染的植物茎部切下, 在75%乙醇中浸泡2 min, 用蒸馏水冲洗干净, 移至磨样袋中, 并加入无菌蒸馏水, 充分研磨, 保留上清液, 将上述溶液梯度稀释, 接种到结晶紫果胶酸琼脂(Crystal violet pectate, CVP)平板上, 28℃孵育2~3 d^[5], 用牙签挑取在CVP平板上出现的单个细菌菌落, 并在营养琼脂上划线, 以获得纯菌落。



图1 田间马铃薯植株黑胫病症状

Figure 1 Symptoms of blackleg on potato plant from the field

1.2 供试菌株DNA提取

将所分离到的细菌置于营养肉汤(Nutrient broth, NB)培养基中, 28℃, 200 r/min振荡培养16 h, 将细菌悬浮液在12 000 r/min下离心2 min, 使用TaKaRa Mini BEST细菌基因组DNA提取试剂盒进行细菌基因组DNA的提取。

1.3 16S rRNA 基因序列分析

使用通用引物8F(AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)和1492R(GGTTACCTTGTTACGA CTT), 对待测菌株进行16S rRNA 基因扩增, 反应体系为: Green Mix, 12.5 μ L, 引物各0.6 μ L, 模板1.0 μ L, ddH₂O 10.3 μ L, 反应程序为: 98 $^{\circ}$ C, 5 min; 98 $^{\circ}$ C, 10 s, 退火温度55 $^{\circ}$ C, 5 s, 72 $^{\circ}$ C, 100 s, 29个循环; 72 $^{\circ}$ C, 5 min。PCR反应使用T100 TM热循环仪(美国Bio-Rad)完成。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 质量良好的PCR产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行Sanger测序, 将获得序列与GenBank数据库中已知序列进行Blast比对, 并利用MEGAX^[6]软件, 使用最大似然法和Tamura-Nei model进行16S系统发育树的构建。

1.4 多位点序列分析

采用多位点序列分析, 对病原菌*proA*(MT427753-MT427756)、*icdA*(MT427761-MT427764)、*mdh*(MT427765-MT427768)、*gapA*(MT427769-MT427772)^[4]、*gyrA*(MT427757-MT427760)和*rpoS*(MT427773-MT427776)^[7]6个管家基因进行PCR扩增, 反应体系为: Prime STAR HS DNA Polymerase(2 $\times$), 12.5 μ L, 引物各0.6 μ L, 模板1.0 μ L, ddH₂O 10.3 μ L, 反应程序为: 98 $^{\circ}$ C, 5 min; 98 $^{\circ}$ C, 10 s, 退火温度59 $^{\circ}$ C, 5 s, 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 29个循环; 72 $^{\circ}$ C, 5 min。PCR反应使用T100 TM热循环仪(美国Bio-Rad)完成。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 质量良好的PCR产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行Sanger测序, 将获得序列与GenBank数据库中已知序列进行Blast比对, 并利用MEGAX^[6]软件, 使用最大似然法和Tamura-Nei model进行MLSA系统发育树的构建。

1.5 致病性检测

1.5.1 植株检测

3株分离菌株悬液(10^6 cfu/mL)以茎基部注射方式侵染马铃薯品种‘费乌瑞它’的幼苗(每株菌侵染5株植株), 以无菌水或营养肉汤(NB)培养基作为对照, 幼苗生长环境保持在相对湿度80%、温度21 $^{\circ}$ C, 侵染7 d后拍照记录^[8]。

1.5.2 薯块检测

选用‘Favorita’种薯, 切成两半, 3株*P. polaris*

菌株菌悬液(10^6 cfu/mL)离心, 弃上清液, 沉淀加入无菌蒸馏水中制成混悬液, 于马铃薯切面的四角及中间部位穿刺并注入100 μ L混悬液, 以无菌水为对照, 3次重复^[9]。接种后处理与对照分别包裹封口膜, 以保持薯块湿度, 于28 $^{\circ}$ C培养2~3 d, 观察发病情况。

2 结果与分析

2.1 16S rRNA 基因序列分析

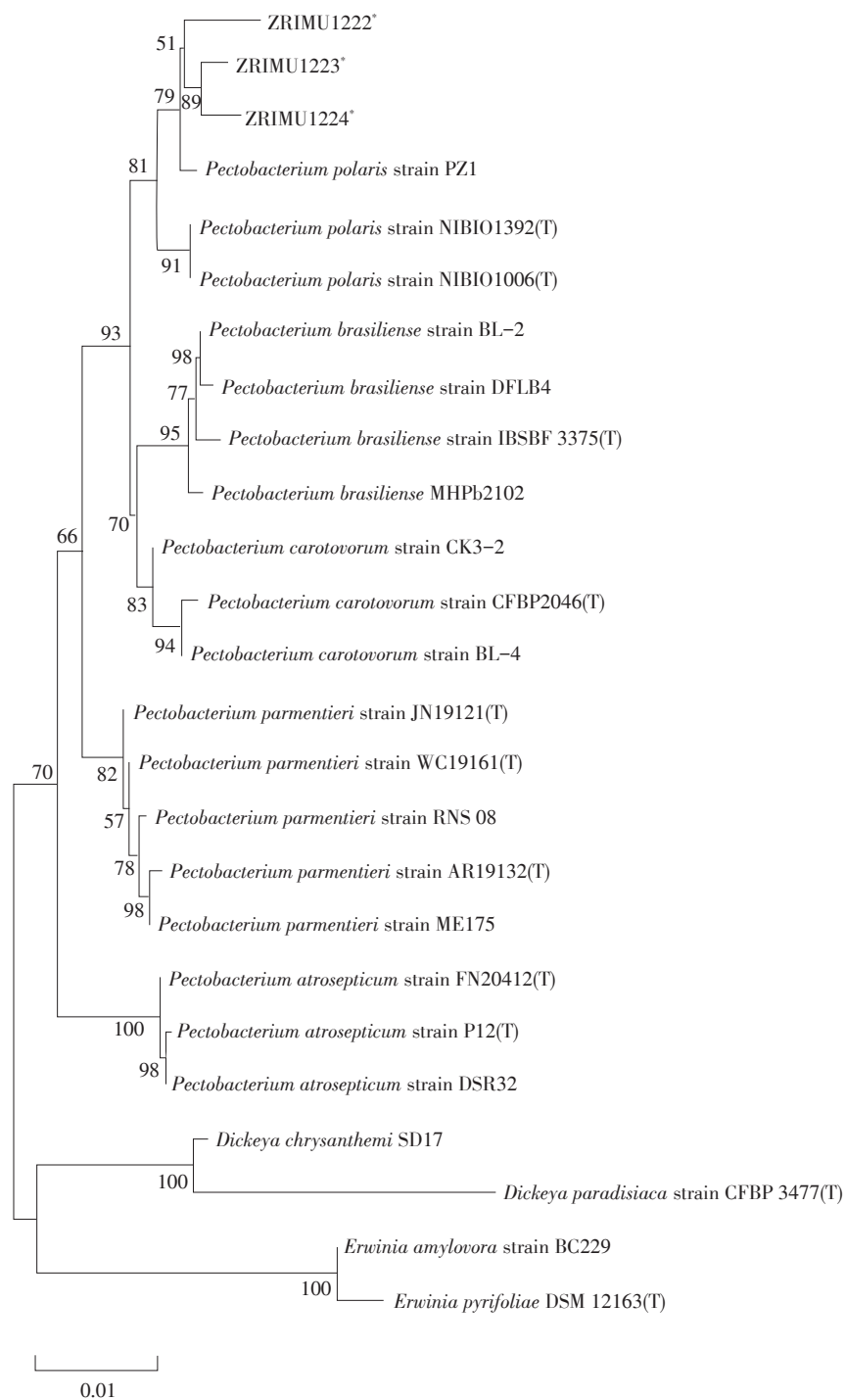
基于16S rRNA基因完整序列, 以*Dickeya* spp. 菌株, 以及*Erwinia* spp. 菌株为外群, 将ZRIMU1222、ZRIMU1223和ZRIMU1224菌株序列(登录号分别为: OP389242、OP389243和OP389244)与已发表的18株果胶杆菌菌株的序列构建系统发育树。结果显示, 本研究分离得到的3个菌株与*P. polaris*菌株构成了明显的分枝, 已发表的*P. atrosepticum*、*P. brasiliense*、*P. carotovorum*与*P. parmentieri*株系形成的类群则分别构成了独立的分枝(图2)。

2.2 多位点序列分析

基于菌株的多位点*rpoS-proA-gapA-icdA-gyrA-mdh*碱基串联序列, 用*Pectobacterium* spp.及其密切相关的物种*Dickeya* spp.的菌株构建系统发育树(图3)。结果显示, 分离株ZRIMU1222、ZRIMU1223、ZRIMU1224亲缘关系较近, 与*Pectobacterium polaris*其他菌株聚集到一起, 同属一个分枝; 与其他*Pectobacterium* spp., *Dickeya* spp.以及*Erwinia* spp.亲缘关系较远。由此, 可以推断出分离株ZRIMU1222、ZRIMU1223、ZRIMU1224这3株菌株具有较高的相似性, 且均来源于果胶杆菌属, 属于*Pectobacterium polaris*。

2.3 致病性检测

用 10^6 cfu/mL的ZRIMU1222、ZRIMU1223和ZRIMU1224菌液和营养肉汤(NB)培养基(对照)注入马铃薯品种‘费乌瑞它’的幼苗, 结果显示注射ZRIMU1222、ZRIMU1223和ZRIMU1224菌液的幼苗均出现症状(茎基部腐烂发黑), 而对照植株无病症, 注射伤口呈愈合状态(图4)。薯块侵染3 d后, 感染*Pectobacterium*的薯块均表现出溃烂发臭的症状(图4), 对照组无病症, 薯肉紧实无溃烂症状。



注：(T) 代表模式菌株，*代表本试验分离的菌株。下同。
Note: (T) represents the type strain and * represents the strain isolated in this experiment. The same below.

图2 基于3株分离株及其他果胶杆菌属菌株 16S rRNA 基因序列的系统进化树
Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of three strains and other *Pectobacterium* strains

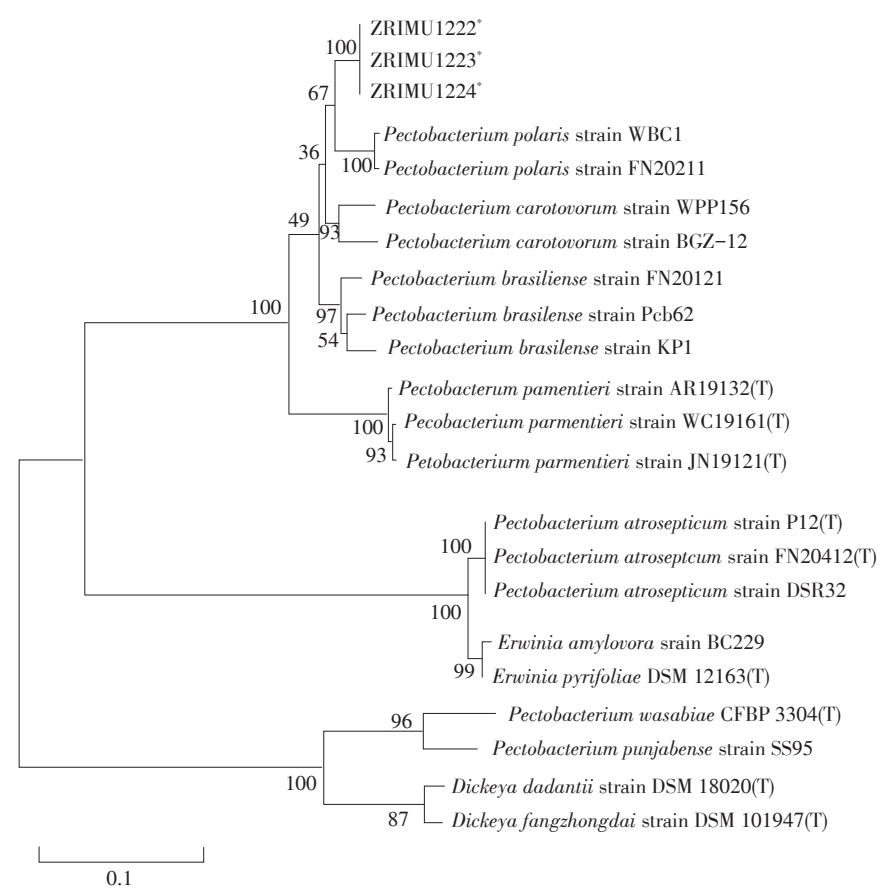
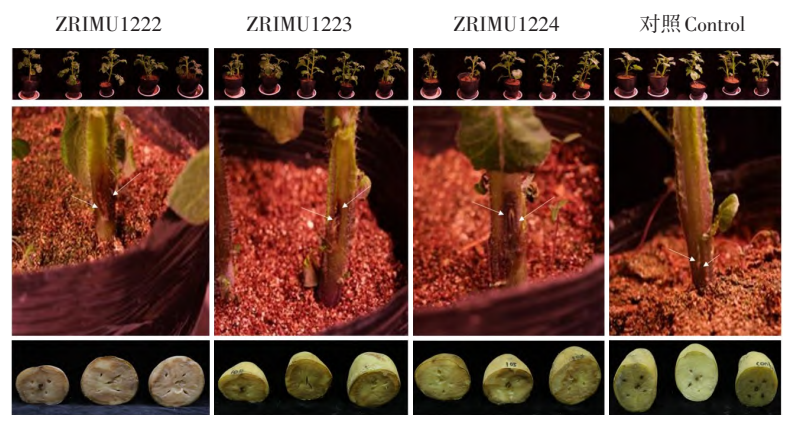


图3 基于3株分离株及其他果胶杆菌属菌株 *rpoS*、*proA*、*gapA*、*icdA*、*gyrA* 和 *mdh* 多位点序列的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on the multi-locus sequence of *rpoS*, *proA*, *gapA*, *icdA*, *gyrA*, and *mdh* of three strains and other *Pectobacterium* strains



注：箭头指示症状部位。
Note: Arrows indicate the site of symptoms.

图4 基于科赫法则将分离株分别感染‘费乌瑞它’幼苗和块茎

Figure 4 'Favorita' seedlings and tubers infected with candidate pathogenic isolates for Koch's postulate test

3 讨 论

马铃薯黑胫病是一种细菌性病害, 在中国马铃薯产区发生严重, 可发生在马铃薯生长发育的各个阶段, 通过影响出苗率、幼苗存活率降低产量, 造成经济损失^[10]。由于马铃薯新品种的更新、检疫制度不健全及种薯跨区调运频繁, 使得马铃薯黑胫病发生呈逐年上升趋势^[11], 新的致病菌逐步走入大众的视野, *Pectobacterium* spp. 属的种和亚种数量逐渐增加。在症状上, 几种致病菌引起的黑胫和软腐症状是类似的, 所以单单依靠表型特征和生理生化测试进行相同种或亚种之间的准确鉴别变得比较困难。DNA 标记、血清学^[12]、16S rRNA 序列^[13]以及多位点序列分析^[14], 在许多植物病原细菌致病亚种和致病型区分方面有较多报道, 是目前较常用的细菌系统发育分类方法。本研究运用生物信息学, 通过对同源序列进行筛选、序列比对、进化树构建、评估进化树4个步骤, 对其基因组进行分析, 所得实验结果均表明, 分离的3个 *Pectobacterium polaris* 菌株与已发表的 *Pectobacterium polaris* 株系共同形成了明显的 *Pectobacterium polaris* 分枝, 且该分枝与其他种(或亚种)形成了不同类群, 由此可以推断这3株分离物属于 *Pectobacterium polaris* 菌株。后续致病性检测表明, 3株分离株均满足科赫法则, 且被侵染的植株维管束病变部位均呈现黑褐色, 被侵染的薯块溃烂发臭。

目前, 青海地区已检测并报道的病原菌为 *Pectobacterium atrosepticum*^[15], 而 *Pectobacterium polaris* 病原菌株尚未报道。近几年, 欧洲国家, 如波兰^[16]、俄罗斯^[17]、土耳其^[18]等对于 *Pectobacterium polaris* 均有报道。在中国, Wang 等^[19]在河北, 首次发现并报道了 *Pectobacterium polaris* 菌株, Handique 等^[20]在内蒙古自治区及四川省相继报道了该菌株。本研究发现的3株病原菌 *Pectobacterium polaris* 在青海省为首次报道, 期望此研究为后续致病机理的研究以及生防菌的开发奠定基础。

[参 考 文 献]

[1] International Potato Center (CIP). Potato [EB/OL]. [2020-10-20].

<https://cipotato.org/potato/>.

- [2] Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, *et al.* Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(12): 5575-5599.
- [3] Charkowski A O. Biology and control of *Pectobacterium* in potato [J]. American Journal of Potato Research, 2015, 92(2): 223-229.
- [4] Ma B, Hibbing M E, Kim H S, *et al.* Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya* [J]. Phytopathology, 2007, 97(9): 1150-1163.
- [5] Handique U, Cao Y, Wang D, *et al.* First report of *Pectobacterium punjabense* causing blackleg and soft rot on potato in Hebei and Fujian Province, China [J]. Plant Disease, 2022, 106(7): 1977.
- [6] Kumar S, Stecher G, Li M, *et al.* MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [7] Waleron M, Waleron K, Geider K, *et al.* Application of RFLP analysis of *recA*, *gyrA* and *rpoS* gene fragments for rapid differentiation of *Erwinia amylovora* from *Erwinia* strains isolated in Korea and Japan [J]. European Journal of Plant Pathology, 2008, 121(2): 161-172.
- [8] Czajkowski R, Perombelon M C M, van Veen J A, *et al.* Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review [J]. Plant Pathology, 2011, 60(6): 999-1013.
- [9] Qiu Z. Cao Zhongda and the study of the Cao Style [J]. Palace Museum Journal, 2006(5): 85-105.
- [10] Wang D, Zhao Y, Liang D, *et al.* Screening and identification of biocontrol strains against potato black shank disease, *Pectobacterium atrosepticum* [J]. Plant Diseases and Pests, 2020, 11(5): 19-23.
- [11] Abu-Obeid I, Khlaif H, Salem N. Detection and identification of potato soft rot *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (DYE1969) by PCR using different sets of primers [J]. Jordan Journal of Agricultural Sciences, 2019, 14(2): 546-556.
- [12] 焦彬彬, 张慧丽, 栗寒, 等. 马铃薯黑胫病菌概述 [J]. 植物检疫, 2017, 31(1): 69-72.
- [13] 程亮. 西北地区马铃薯软腐病和黑胫病致病菌鉴定及特性分析(英文) [J]. 中国农业科技导报, 2020, 22(7): 106-116.

- [14] 田艳丽, 胡旭东, 赵玉强, 等. 内蒙古马铃薯黑胫病原菌的分离和鉴定 [J]. 植物病理学报, 2018, 48(6): 721–727.
- [15] Wang X, Cheng L, Wang Y Y, *et al.* Identification of blackleg pathogen on potato (*Solanum tuberosum* L.) in Qinghai [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2018, 30(8): 1369–1375.
- [16] Waleron M, Misztak A, Jońca J, *et al.* First report of *Pectobacterium polaris* causing soft rot of potato in Poland [J]. Plant Disease, 2019, 103(1): 144.
- [17] Voronina M V, Lukianova A A, Shneider M M, *et al.* First report of *Pectobacterium polaris* causing soft rot and blackleg of potato in Russia [J]. Plant Disease, 2021, 105(6): 1851.
- [18] Öztürk M. First report of *Pectobacterium polaris* causing blackleg disease on potato plants in Turkey [J]. Journal of Plant Pathology, 2022, 104(3): 1145.
- [19] Wang J, Han W, Li Z, *et al.* First report of *Pectobacterium polaris* causing aerial stem rot of potato in China [J]. Plant Disease, 2022, 106(2): 755.
- [20] Handique U, Cao Y, Feng Z, *et al.* First report of *pectobacterium polaris* causing blackleg on potato in Inner Mongolia and Sichuan Province, China [J]. Plant Disease, 2022, 106(4): 1292.

书

讯

现有《中国马铃薯》杂志 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020 和 2021 年精装合订本, 中国马铃薯大会论文集 2011 年《马铃薯产业与科技扶贫》, 2012 年《马铃薯产业与水资源高效利用》, 2013 年《马铃薯产业与农村区域发展》, 2014 年《马铃薯产业与小康社会建设》, 2015 年《马铃薯产业与现代可持续农业》, 2016 年《马铃薯产业与中国式主食》, 2017 年《马铃薯产业与精准扶贫》, 2018 年《马铃薯产业与脱贫攻坚》, 2019 年《马铃薯产业与健康消费》, 2020 年《马铃薯产业与美丽乡村》和 2021 年《马铃薯产业与绿色发展》, 每本定价 100 元。有需要的读者, 可与《中国马铃薯》编辑部联系。

联系电话: 0451-55190003