

马铃薯疮痂病菌的多样性研究

孙艳丽 摘译

(东北农业大学 哈尔滨 150030)

要防除马铃薯疮痂病首先必须研究土壤中的病原菌生态特点。为此, 对病原菌进行合理的分类, 并探讨了解病原菌的多样性是很有必要的。本研究从日本各地收集的病斑上所分离出的马铃薯疮痂病菌和已知的种 *S. scabies*, *S. acidiscabies* 进行了表现型和基因型方面的比较, 并从分类学上进一步探讨了马铃薯疮痂病菌的多样性。

1 试验方法

1.1 菌株

从 4 个地方的马铃薯疮痂病斑上分离出了已登记过的 9 个菌株。从北海道分离出了至今还没有登记过的 15 个菌株, 这些菌株分别来自于不同类型的土壤。为了便于进行比较, 本试验同时利用了 *S. scabies* 的标准菌株 (Type, culture) ATcc49173 和 *S. acidiscabies* 的标准菌株 ATcc49003。虽然 *Streptomyces* 属放线菌是主要的土壤微生物, 但做为植物病原菌是非常稀少, 所以也为了比较研究这些少数病原菌在内的各病原菌间的关系, 本研究同时供试了马铃薯橡皮

病菌。

1.2 病菌形态及生理特性

参照 Shirling 和 Gottlieb 的方法观察了白蛋白琼脂培养基上培养的病菌孢子的颜色和孢子链的形态。

在本研究中病菌生理特性的调查项目仍然参照了 Lambert 和 Loria 所用过的方法。即根据 Shirling 和 Gottlieb 的方法在蛋白胨 (Peptone) 酵母提取液 (yeast extract)、铁琼脂培养基和酪氨酸 (tyrosin) 琼脂培养基上观察了黑色素生成能力。

根据 Pridham 和 Gottlieb 的方法观察了炭源的自养性, 依照 Williams 等人的方法观察了氮源利用和多聚半乳糖醛酸、黄嘌呤、木聚糖的自养性以及生长抑制剂的耐性。依照 Ilutiner 的方法观察了 albutin 的自养性, 根据 Williams 等人的方法在无菌条件下把用高压灭菌的 50 mM 磷酸二氢钠和过滤灭菌的 50 mM 琥珀酸混合成 pH6.0 的溶液, 然后此溶液和灭菌过的 Williams 基本液体培养基按 4:1 的比率混合, 同 NaOH 和 HCl 溶液把含有上述混合液的培养基 pH 调整到 3.5~6.0, 每个培养基的

此, 在栽培中, 可以通过改变施肥方式, 降低马铃薯块茎膨大区域的离子强度来抑制病害的发生。应用这种施肥方法, 并配合以肥料中铵离子硝化降低 pH 值的作用, 即使在可溶性硅酸含量较高的铝石英质土壤上, 防治马铃薯疮痂病也是可能的。在 pH 值较高的土壤上, 则有必要采用硫酸铝或其他方法

降低土壤 pH 值。而在非铝石英质土壤上栽培马铃薯, 则没有必要调整土壤 pH 值。

以上通过改变施肥方式或调整土壤中离子强度来减轻土壤病害的方法, 迄今尚未见有报道, 如果这种方法能够实际应用到马铃薯疮痂病的防治上, 无论从经济效益上还是在环境保护上, 都将是最理想的防病方法。

pH 相差为 0.5, 然后把病原菌接种到上述培养基, 在 25℃ 下培养 5~7 d, 观察病原菌的生长情况。

1.3 聚类分析

参照 Lambert 和 Loria 的方法根据病菌形态及生理特性的观察结果计算菌株间的一致系数 (simple matching coefficient: Ssm), 并把它做为相似度。即先计算菌株间各特性一致的个数所占的百分数, 然后根据群体平均法进行聚类分析。

1.4 DNA 的提取与 DNA 的相同性试验

DNA 的提取是按照 Hopwood 的方法进行。在 25 mL LB 培养基上培养并过滤后所得到的菌体里加 3 mL 溶菌酶溶液包括 0.3 M 蔗糖, 25 mM Tris-盐酸缓冲液 (pH8.0), 25 mL EDTA (pH8.0) 2g/L⁻¹ 溶菌酶。37℃ 下溶菌 30~60 min, 然后加 10 g/L⁻¹ 蛋白酶溶液 0.5 mL 37℃ 下放置 min, 最后加 100 g/L⁻¹ SDS 溶液 0.6 mL。保温静置 30 min。用酚、氯仿、异戊醇 (50:50:1) 溶液除去蛋白质 2 次, 而后用 isopropanol 沉淀核酸, 把沉淀的核酸用 TE 缓冲液包括 10 mM Tris-盐酸缓冲液, 1 mM EDTA (pH8.0) 溶解。加 RNaseA 分解 RNA, 用酚处理后, 以乙醇沉淀 DNA, 再用 TE 缓冲液溶解 DNA。然后从供试菌株中选择全国各地的代表性菌株进行了 DNA 相同性试验。

1.5 RFLP 分析试验

从供试菌株中选取涉及全国的代表性菌株对疮痂病致病性有关的酯酶基因进行了 RFLP 分析试验。本试验以 *S.scabies* FLI 菌株的酯酶基因碱基顺序中选取 5'-AAC.....AC-3' 及 5'-CTG...TTC-3' 片段做模板, 利用 DNA 合成机, 合成了这二种低聚核苷酸, 并把它分

别做为 est₁ 和 est₂ 标记。

2 试验结果

2.1 病菌形态及生理特性

本试验观察结果表明, 病原菌孢子链的形态有螺旋状 (SPIRAL: S), 直~波状 (FLEXUOUS: F), 半螺旋状 (RETINACULUM-APERTUM: RA) 等 3 种类型。在马铃薯疮痂病斑上分离出的菌株可划分为 S 和 F 两类群, 这与谷井、片山、Tashiro 等人的结果相一致, 从马铃薯象皮病斑上分离出的菌株是表现 RA 型。黑色素生成能力上只有 S 菌株呈阳性, F 菌株和 RA 菌株均呈阴性, 在其它调查项目中没发现与形态相一致的差异。但 F 菌株中发现了在 pH3.5~4.5 环境中能生长的菌, 这些菌同在酸性土壤上生长的马铃薯疮痂病菌 *S. acidiscabies* 具有很多的共同性, 其孢子链形态是 F 型, 不产生黑色素。

2.2 聚类分析

根据形态及生理特性, 利用群体平均法所进行的聚类分析结果表明, 供试的 25 个菌株以 70% 的相似度聚类成 2 个类群, 而以 78% 的相似度聚类成 6 个类群。在上述聚类分析结果中, 孢子链的形态及黑色素的生成能力占很大的比重。在 F 菌株中, 从九州分离出的菌株和北海道分离出的菌株分别以 91% 的相似度划为同一类群, 在本研究中虽然计算了各供试菌株同 *S. scabies* 及 *S. acidiscabies* 标准菌株的相似度, 但由于计算时的项目数与各供试菌株间计算时的项目数不同, 所以在聚类分析上只用相似度进行了比较。其结果表明, 在 S 菌株中有 4 个菌株表现同 *S.scabies* ATcc49173, 80% 以上的相似度, 在 F 菌株中有 2 个菌株表现同 *S.acidiscabies* ATcc49003, 80% 以上的相似度。

2.3 DNA 相同性试验

DNA 相同性试验结果表明, S 菌株和 F 菌株间相同性很小。从九州和本州分离出的 S 菌株彼此间表现很大的相同性(52%~100%), 但与北海道分离出的 S 菌株间表现很小的相同性(18%)。从九州分离出的 F 菌株彼此间以及北海道分离出的 F 菌株彼此间表现很大的相同性(66%和 52%), 但九州和北海道的 F 菌株之间的相同性很小(5%~6%)。从千叶县和北海道分离出的 RA 菌株之间表现很大的相同性(89%)。从九州分离出的 S 菌株和 F 菌株分别同 *S.scabies*, ATcc49173 和 *S.acidiscabies* ATcc 49003 表现很大的相同性(66%和 52%~100%)。在 S 菌株和 F 菌株内, 九州的菌株和北海道的菌株之间 DNA 的相同性很小, 这与 TASHIRO 的结果是相一致的。

2.4 RFLP 分析

验证 *S.scabies* FLI 菌株的酯酶基因低聚核苷酸片断大小结果表明, 在 S 菌株中除了北海道菌株外的 7 个菌株分别与 *est*₁ 的 16.6 kb 片断和 *est*₂ 的 7.3 kb 片断或其中一个片断具有共通性。但也有个别菌株 *est*₁ 和 *est*₂ 的部分片断表现不同。在 F 菌株中, 北海道菌株只有与 *est*₁ 的 7.3 kb 片断表现共同性, 而其它片断没表现共同性。*S.scabies* ATcc49173 标准菌株的 *est*₁ 的 16.6 kb 片断同九州和本州分离出的 S 菌株表现很多的共同性。

3 讨论

在本研究中, 从马铃薯疮痂病斑和橡皮病斑上分离出的病菌其根据孢子链的形态差异可划分成 3 种类型(S、F、RA)。过去在日本所报道的马铃薯疮痂病病原菌孢子链形态有 S 型和 F 型。还有报道指出存在不具有黑色素生成能力的 S 型病原菌。但本

研究表明, 黑色素生成能力的有无与形成差异是完全一致的, 即只有 S 型病原菌具有黑色素生成能力, 并且只有从马铃薯象皮病斑上分离出的病菌孢子链形态是 RA 型。这说明象皮病病原菌同马铃薯疮痂病菌分别属于不同的种, 这与过去的研究结果是一致的。

已有报道指出, 马铃薯疮痂病的主要病原菌有 *S. scabies* (标准菌株 ATcc49173) 和酸性土壤中的 *S. acidiscabies* (标准菌株 ATcc49003)。 *S. scabies* 标准菌株同本研究所供试的 S 菌株相比较, 在基本特性上都是一致, 即孢子链形态是 S 型, 黑色素生成能力是阳性, 能利用 ISP 调查项目中的所有糖类等。但其它生理特性方面菌株之间有差异, 并且没有明显的一致现象。然而, 在相似度上九州和本州的部分菌株同 ATcc49173 标准菌株表现 80% 以上的高值, 说明上述菌株同 *S. scabies* 标准菌株相类似。ATcc49003 标准菌株同所供试的 F 菌株比较结果表明, 两者的孢子链形态都为 F 型, 黑色素生成能为阴性, 说明在这方面两者的性质是一致。然而 *S. acidiscabies* 标准菌株不能把棉籽糖做炭源可利用, 而所供试的所有 F 菌株都能把棉籽糖做炭源可利用, 其它生理特性方面菌株之间没有明显的一致现象。九州的 2 个菌株同 *S. acidiscabies* 的标准菌株在特性上很一致, 与标准菌株间的相似度方面也表现 83% 的高值, 这表示上述 2 个菌株可能是 *S. acidiscabies*。Williams 根据 *Streptomyces* 属 475 (包括标准菌株在内) 个菌株的 139 项调查性状结果计算了相似度 (Ssm%), 按 77.5% 相似度把上述 475 个菌株分成 77 个组群, 这些组群分别相当于 *S. scabies* 及 *S. acidiscabies*。但 Sneath 提出计算相似度时所依据的性状数口应该是 50 个以上。因此, 在本研究中只根据几个表现性状计算相似度, 并由此断

定供试分离菌株与 *S. scabies* 及 *S. acidiscabies* 标准菌株间的亲缘关系认为定论的可靠性较差。

根据 DNA 的相同性来定论种间的关系时, 其相同性应该是 70% 以上。但也有人建论相同性 60% 以上就可认定属于同一种。因此可知, DNA 的相同性应达到百分之多少才能认定是属于同一种, 则是人为的问题常有争论。然而, DNA 的相同性则是了解同属种间的近缘菌株之间亲缘关系的有效方法, 其数值的大小表示菌株之间亲缘关系的远近。

根据本试验结果认为, 本州和九州的 S 菌株与 *S. scabies* ATcc49173 标准菌株间亲缘关系较近, 与北海道的 S 菌株间亲缘关系较远。九州 (佐贺县) 的 F 菌株彼此之间及北海道的 F 菌株彼此之间亲缘关系较近, 但九州和北海道的 F 菌株之间亲缘关系较远。*S. acidiscabies* ATcc49003 标准菌株与九州的 F 菌株间亲缘关系较近, 从马铃薯象皮病斑中分离出的本州和北海道的 RA 菌株表现很高的相同性, 认为彼此间亲缘关系较近。

本试验的 RFLP 分析结果表明, 九州及本州的 S 株同 *S. scabies* ATcc49173 株具有很高的相似性, 但同北海道的 S 株差异很大, 这与 DNA 相同性试验所表示的菌株的菌株间血缘关系结果相一致。Doering-saad 等人利用 *S. coelicolor*, IMET40271 菌株的 rRNA 操纵子合成 7.2 kb 的 DNA 标记, 用它所进行的 RFLP 分析结果表明, 马铃薯疮痂病菌在遗传上是多种多样的, 并指出要开发马铃薯疮痂病菌的简单检测方法, 首先要明确疮痂病菌所共有的致病基因。这次所探讨的软木脂分解酯酶基因是把分解马铃薯表层的软木脂酯酶做

Cadc, 它在病原菌侵入上是很重要。因此可以把酯酶基因做为马铃薯疮痂病菌检测及识别中的有效标记。另外在本试验中以软木脂分解酯酶基因为模板合成的低聚核苷酸并没有与供试的全部病原菌株形成杂合体。因此, 认为疮痂病菌的酯酶基因稳定性较低。

Lawrence 和 King 等人从马铃薯疮痂病斑上分离出诱道疮痂病的化学物质 Vivotoxin thaxtomin, 并确认此物质的生成能力大小与 *S. scabies* 的致病性间存在着正相关, 因此今后此物质的生成能力大小指标可用于病原菌的判定上。

由上述结果可知, 在日本存在着表现型和遗传型两方面均不同的多种疮痂病菌, 而且病菌种类至少有 4 种, 其中 2 种是在分类学上与 *S. scabies* 及 *S. acidiscabies* 亲缘关系非常近, 其余 2 种是与 *S. scabies* 和 *S. acidiscabies* 亲缘关系较远, 有可能相当于不同的种, 而且这些不同的病菌都是从北海道分离出来的, 说明北海道的病原菌有特异性。目前很难只根据表现型判断病原菌的种类, DNA 相同性试验对探明马铃薯疮痂病原菌种类以及与已知病原菌株间的关系则是很有效的手段。但形态和生理特性均不同的本州 S 菌之一的 4015 菌株 DNA 和北海道 RA 菌之一的 S-r-2 菌株 DNA 表现着 50% 的相同性。这就说明, 要明确象同属的种之间这样亲缘关系比较近的菌株间的亲缘关系时, 有必要根据形态及生理特性和 DNA 相同性试验综合起来进行详细的分析。在遗传上多种多样的 *Streptomyces* 属放线菌株具有致病性这一事实可知, 要详细地分析病原菌则利用与致病性有关的 DNA 水平上进行检测病原菌是一种很有效的方法, 今后需要进一步研究发病机理和病原基因的解明。