

云南甘蔗白条病的多基因联合鉴定

张荣跃, 李文凤, 王晓燕, 单红丽, 仓晓燕,
李 婕, 罗志明, 尹 炯, 黄应昆*

(云南省农业科学院甘蔗研究所, 云南省甘蔗遗传改良重点实验室, 开远 661699)

摘要 甘蔗白条病是由白条黄单胞菌 *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson 引起的甘蔗重要病害。2017 年在云南保山、孟定和金平蔗区的甘蔗上发现疑似白条病的病害。从病株蔗茎中分离得到圆形, 凸面, 光滑, 有光泽, 黄色的细菌菌落。经柯赫氏法则验证, 分离得到的细菌为该病害的病原菌。使用 16S rRNA 基因、*gyrB* 基因和 *rpoD* 基因对分离得到的病原菌进行了分子鉴定, BLAST 和系统发育分析表明本研究所获得的病原菌的 3 个基因的核苷酸序列与白条黄单胞菌 GPE PC73 菌株 (GenBank 登录号: FP565176) 对应基因的核苷酸序列一致性均为 100%, 在系统发育树中处于同一分支。根据田间症状诊断、柯赫氏法则验证及分子鉴定结果, 确认云南保山、孟定和金平发生的甘蔗病害为 *X. albilineans* 引起的甘蔗白条病。

关键词 甘蔗白条病; 白条黄单胞菌; 系统发育分析; 云南

中图分类号: S 432.42 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018178

Identification of sugarcane leaf scald based on multiple gene sequences in Yunnan Province

ZHANG Rongyue, LI Wenfeng, WANG Xiaoyan, SHAN Hongli, CANG Xiaoyan,
LI Jie, LUO Zhiming, YIN Jiong, HUANG Yingkun

(Sugarcane Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Yunnan Key
Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement, Kaiyuan 661699, China)

Abstract Leaf scald caused by *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson is an important disease of sugarcane. In 2017, suspected sugarcane leaf scald was found in Baoshan, Mengding and Jinping of Yunnan Province. Circular, convex, smooth, shiny, yellow pigmented bacterial colonies were isolated from symptomatic stalks. The result of Koch's postulates showed that the isolated bacteria were the causal agent of the disease. Molecular identification of pathogenic bacteria was carried out based on 16S rRNA gene, *gyrB* gene and *rpoD* gene. BLAST analysis showed that the amplified nucleotide sequences of three genes shared 100% sequence identity with that of corresponding genes of *X. albilineans* strain GPE PC73 (accession no. FP565176). Phylogenetic analysis showed that all isolates in this study and *X. albilineans* were clustered together into one branch. Base on the result of symptom diagnosis in the field, validation of Koch's postulates and molecular identification, the sugarcane disease occurred in Baoshan, Mengding and Jinping was confirmed to be leaf scald caused by *X. albilineans*.

Key words sugarcane leaf scald; *Xanthomonas albilineans*; phylogenetic analysis; Yunnan

甘蔗白条病是由白条黄单胞菌 *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson 引起的甘蔗重要病害之一, 其对甘蔗的危害是毁灭性的, 常造成巨大的经济损失^[1-2]。该病害于 19 世纪 20 年代在印度尼西亚爪哇岛、澳大利亚和斐济被首次报道, 现已广泛发生于

美国、古巴、巴西、澳大利亚、法国、印度和巴基斯坦等 40 多个植蔗国家和地区^[3]。2016 年在我国广西蔗区首次检测到甘蔗白条病^[4]。甘蔗白条病是一种细菌性维管束病害, 可通过带病蔗种进行远距离传播, 在田间还可通过刀具和收获工具等机械传播, 也可通过

收稿日期: 2018-04-25 修订日期: 2018-05-23

基金项目: 国家现代农业糖料产业技术体系建设专项 (CARS-170303); 云岭产业技术领军人才培养项目 (2018LJRC56); 云南省现代农业产业技术体系建设专项 (YNGZTX-4-92)

* 通信作者 E-mail: huangyk64@163.com

气流和雨水传播,且传播性极强^[5-6]。*X. albilineans* 目前仍是中国进境植物重要的检疫对象之一^[7]。

目前,除云南外,在广西、广东、海南、福建均发现了甘蔗白条病^[8]。2017 年在云南保山、孟定和金平蔗区的甘蔗上发现了疑似白条病的病害。为明确这些病害是否是由 *X. albilineans* 引起的甘蔗白条病,本文采用了病害田间症状观察、柯赫氏法则验证,同时结合 16S rRNA 基因、*gyrB* 基因和 *rpoD* 基因序列分析对病原进行了鉴定,旨在为该病害的防控和研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 甘蔗白条病样品

2017 年从云南孟定、保山和金平蔗区采集 18 份疑似甘蔗白条病样品,MD1S~MD7S 来自孟定,品种为‘柳城 03-1137’;BSH1S~BSH5S 来自保山,品种为‘桂糖 08-1589’;JP1S~JP6S 来自金平,品种为‘ROC1’。

1.2 病原分离培养及回接试验

将蔗茎用无菌水清洗干净,切成 5~8 cm,使用 75%乙醇溶液表面消毒 20 s,然后点火将蔗茎表面乙醇溶液烧尽,连续进行 2 次。将蔗茎放入灭菌的 50 mL 离心管中,3 000 r/min 离心 10 min,吸取离心管底部蔗汁,使用 1×PBS 缓冲液按 10^{-1} ~ 10^{-8} 进行梯度稀释,每个梯度稀释液吸取 50 μ L 在琼脂

MW 培养基进行涂板。琼脂 MW 培养基配方参照 Davis 等^[9],培养基 pH6.8~7.0。配制培养基的所有试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。28℃培养 6~8 d 后,挑取单菌落进行纯化培养。收集纯培养的菌体,用蒸馏水配制成 1×10^8 cfu/mL 接种悬浮液,对温室种植的甘蔗进行人工接种,接种方法参照 Rott 等^[10]的方法。以无菌水处理作对照,观察病害发生发展情况,并对接种后发病的植株进行病原菌再分离。

1.3 菌株 DNA 提取

将纯化培养的菌株分别转接至 2 mL MW 液体培养基中,于 28℃、200 r/min 条件下培养 7 d,12 000 r/min 离心收集菌体,弃上清,使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司)提取 DNA。DNA 提取步骤参照试剂盒说明书。

1.4 多位点基因序列扩增

扩增 *X. albilineans* 的 16S rRNA 基因、*gyrB* 基因和 *rpoD* 基因的引物参考文献[11],引物序列见表 1。25 μ L 扩增反应体系包括 ddH₂O 10.5 μ L、2×Easy Taq PCR SuperMix 12.5 μ L、DNA 模板 1.0 μ L、上、下游引物各 0.5 μ L (20 μ g/ μ L)。PCR 扩增程序为:95℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,55℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,25 个循环;72℃延伸 10 min。取 10 μ L 扩增产物在 1.5%的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

表 1 本研究使用的扩增引物
Table 1 Primers used in this study

基因 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence
16S rRNA	63f	CAGGCCTAACACATGCAAGTC
	1387r	GGCGGGWGTGTACAAGGC
<i>gyrB</i>	UP-1	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGNAARTTYGA
	UP-2r	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCACRTCTCNGTCAT
<i>rpoD</i>	70F	ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMGNGARATGGGNACNGT
	70R	ATAGAAATAACCAGACGTAAGTTNGCYTCNACCATYTCYTTYTT

1.5 PCR 产物克隆、测序及序列分析

使用琼脂糖凝胶回收试剂盒(北京天根生化科技有限公司)回收 PCR 产物目的片段,并将其与 pEASY-T5(北京全式金生物技术有限公司)进行连接转化,每个转化挑选 6 个阳性克隆送华大基因测序。测序结果使用 BLAST 进行对比。使用 DNAMAN V 6.0 进行序列一致性分析。运用 MEGA V 6.0 软件构建系统进化树^[12],采用 neighbor-joining 法建树,模式选择 Kimura

2-parameter,自举检测(bootstrap)重复 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 田间症状观察

2017 年在云南保山、孟定和金平蔗区的甘蔗上观察到疑似白条病的病害。病害症状主要表现为叶片上产生白色条纹,沿维管束伸展,有的叶片大面积白化。染病较重的病株蔗茎节间变短,叶片短直,茎

的节部长出许多侧芽和细小的分蘖,分蘖的叶片上也出现上述的白色条纹(图 1a)。

2.2 柯赫氏法则验证

从保山、孟定和金平采集的蔗茎样品中均分离得到圆形,凸面,光滑,有光泽,黄色的细菌菌落(图 1b)。对分离到的菌株进行回接验证,接种 20 d 后,

接种甘蔗植株的叶片上出现了白色条纹,新发出的叶片叶尖白化,症状与田间发病症状相似(图 1c)。对照甘蔗没有观察到任何症状。从接种发病的蔗茎中重新分离得到了相同的黄色菌落。经柯赫氏法则验证,从蔗茎中分离得到的该细菌为甘蔗白条病的病原菌。

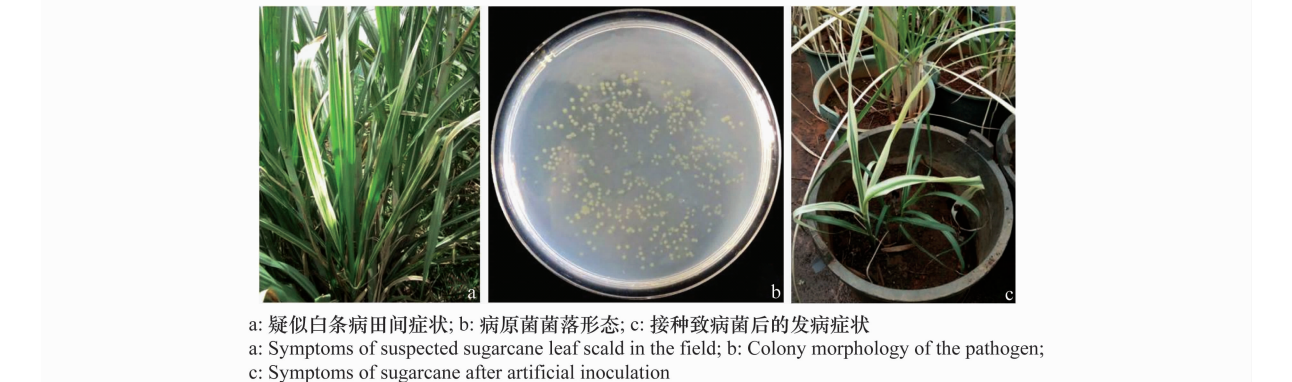


图 1 甘蔗疑似白条病症状和病原菌菌落形态

Fig. 1 Symptoms of suspected sugarcane leaf scald and colony morphology of the pathogen

2.3 病原菌的多基因联合鉴定

本研究测定了获得的所有菌株的 16S rRNA 基因、*gyrB* 基因和 *rpoD* 基因的部分序列(表 2)。结果表明,来自云南孟定、保山和金平的 18 个菌株的这 3 个基因的核苷酸序列一致性均为 100%,与 *X. albilineans* 菌株 GPE PC73 菌株(GenBank 登录号: FP565176)的 3 个基因的核苷酸序列一致性也

均为 100%。分别使用这 3 个基因序列与黄单胞菌属的其他种构建了系统发育树(图 2~4)。在基于 16S rRNA 基因、*gyrB* 基因和 *rpoD* 基因构建的 3 个系统发育树中,本研究所获得的菌株与 *X. albilineans* 菌株均处于同一分支,明显区分于黄单胞菌属的其他种,表明本研究获得的病原菌与 *X. albilineans* 亲缘关系最近。

表 2 菌株来源及其 3 个基因的 GenBank 登录号

Table 2 Origin of *Xanthomonas albilineans* strains and GenBank accession number

菌株编号 Strains no.	来源地 Geographic origin	品种 Variety	GenBank 登录号 GenBank accession number		
			16S rRNA	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
MD1S	云南孟定	柳城 03-1137	MG661788	MG676595	MG676631
MD2S	云南孟定	柳城 03-1137	MG661789	MG676596	MG676632
MD3S	云南孟定	柳城 03-1137	MG661790	MG676597	MG676633
MD4S	云南孟定	柳城 03-1137	MG661791	MG676598	MG676634
MD5S	云南孟定	柳城 03-1137	MG661792	MG676599	MG676635
MD6S	云南孟定	柳城 03-1137	MG661793	MG676600	MG676636
MD7S	云南孟定	柳城 03-1137	MG661794	MG676601	MG676637
BSH1S	云南保山	桂糖 08-1589	MG661795	MG676602	MG676638
BSH2S	云南保山	桂糖 08-1589	MG661796	MG676603	MG676639
BSH3S	云南保山	桂糖 08-1589	MG661797	MG676604	MG676640
BSH4S	云南保山	桂糖 08-1589	MG661798	MG676605	MG676641
BSH5S	云南保山	桂糖 08-1589	MG661799	MG676606	MG676642
JP1S	云南金平	ROC1	MG661800	MG676607	MG676643
JP2S	云南金平	ROC1	MG661801	MG676608	MG676644
JP3S	云南金平	ROC1	MG661802	MG676609	MG676645
JP4S	云南金平	ROC1	MG661803	MG676610	MG676646
JP5S	云南金平	ROC1	MG661804	MG676611	MG676647
JP6S	云南金平	ROC1	MG661805	MG676612	MG676648

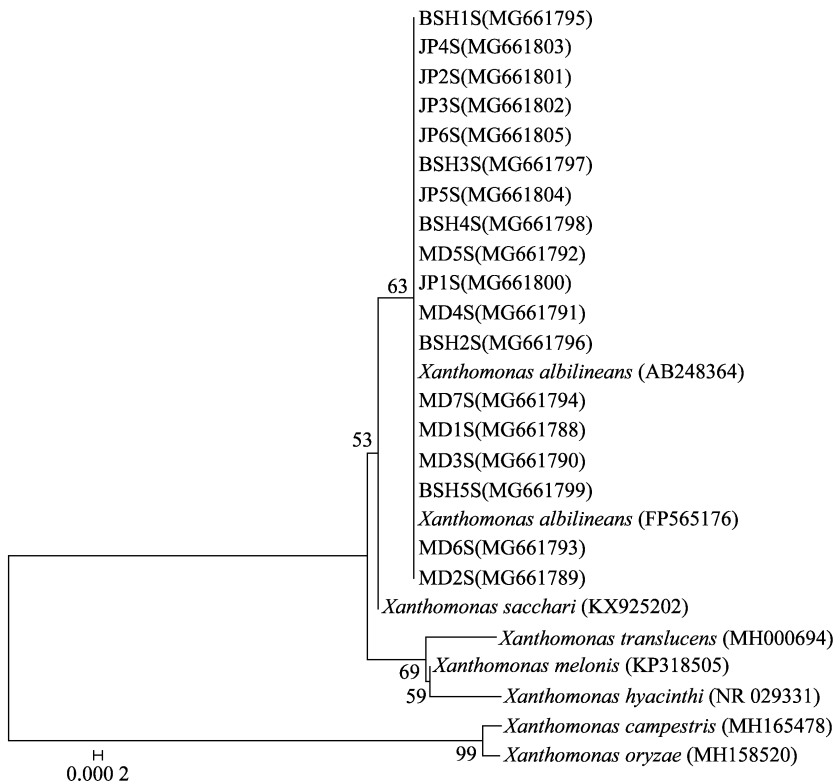


图 2 基于 16S rRNA 基因部分序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on partial sequences of 16S rRNA gene

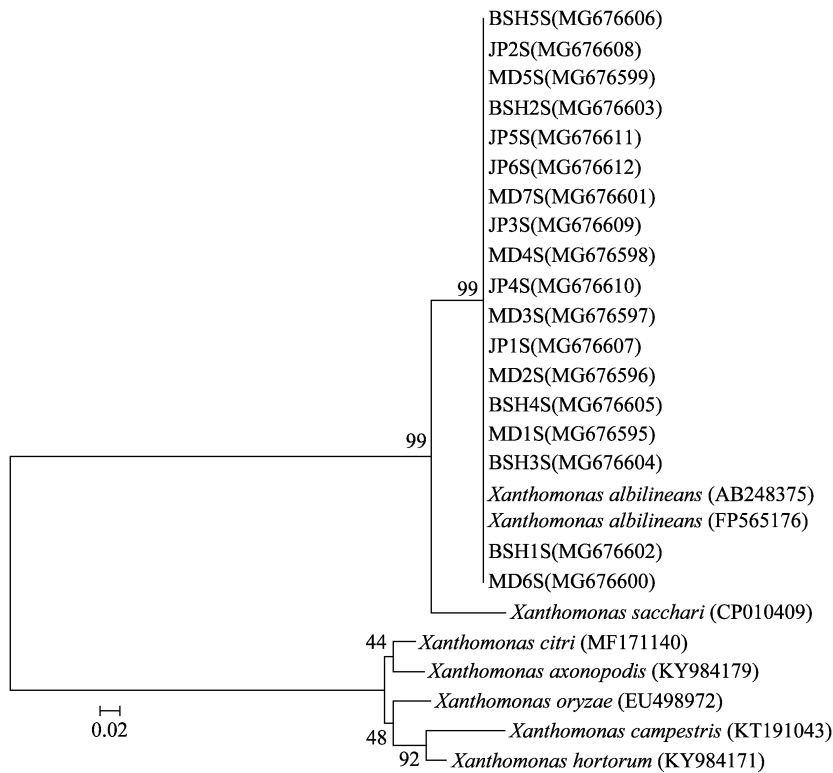


图 3 基于 gyrB 基因部分序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on partial sequences of gyrB gene

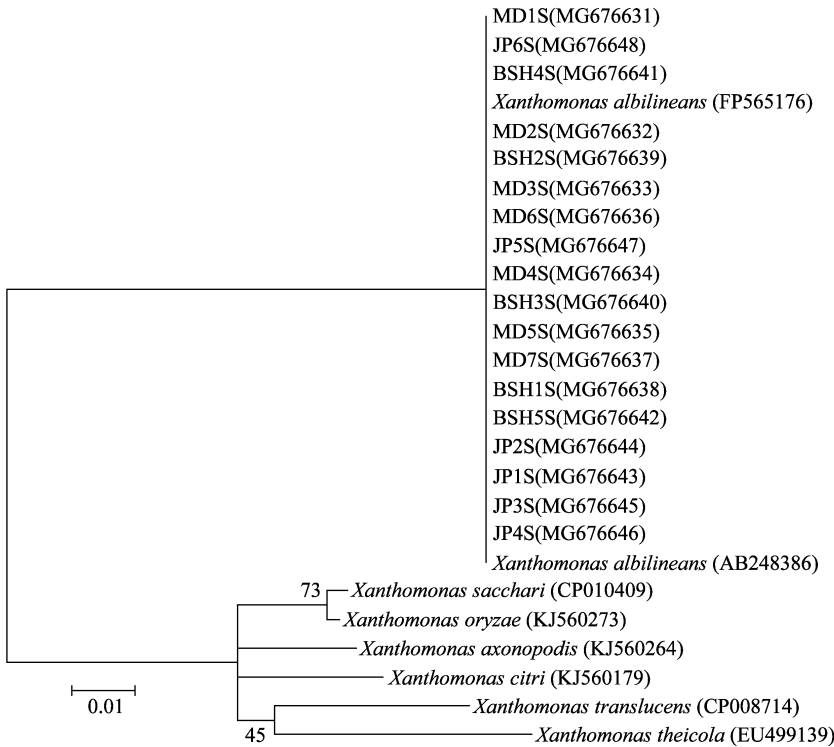


图 4 基于 *rpoD* 基因部分序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on partial sequences of *rpoD* gene

3 结论与讨论

甘蔗白条病是由 *X. albilineans* 引起的甘蔗重要病害。本研究通过对采自云南保山、孟定和金平蔗区的疑似白条病病株进行病原菌分离纯化,柯赫氏法则验证,并结合 16S rRNA 基因、*gyrB* 基因和 *rpoD* 基因部分序列对分离得到的菌株进行了分子鉴定,最终确定云南保山、孟定和金平蔗区发生的病害为 *X. albilineans* 引起的甘蔗白条病。本研究可为中国今后开展甘蔗白条病的深入研究和科学有效防控奠定基础 and 提供参考依据。

甘蔗白条病是一种易随种苗传播的危险性病害,对甘蔗生产和发展有潜在的威胁。本研究采集的样品均来自各蔗区的甘蔗新品种和良种繁育基地,因此,有必要加强对良繁基地扩繁种苗和引进及外调甘蔗的白条黄单胞菌的检疫和监测,从源头上控制白条黄单胞菌扩散蔓延,确保甘蔗安全生产和蔗糖产业可持续发展。另外,今后在加强白条病检疫和监测的同时,应加强甘蔗白条病优良抗原材料和抗病品种的评价筛选,为选育和利用抗病品种有效防控甘蔗白条病提供优良抗原材料。

参考文献

[1] HOY J W, GRISHAM M P. Sugarcane leaf scald distribution, symptomatology, and effect on yield in Louisiana[J]. Plant Disease, 1994, 78(11): 1083 - 1086.

[2] ROTT P, SOUPA D, BRUNET Y, et al. Leaf scald (*Xanthomonas albilineans*) incidence and its effect on yield in seven sugarcane cultivars in Guadeloupe [J]. Plant Pathology, 1995, 44(6): 1075 - 1084.

[3] RICAUD C, EGAN B T, GILLASPIE A G, et al. Disease of sugarcane: MAJOR disease [M]. New York: Elsevier Science Publishing Company Incorporated, 1989: 39 - 58.

[4] ZHANG R Y, SHAN H L, LI W F, et al. First report of sugarcane leaf scald caused by *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson in the province of Guangxi, China [J]. Plant Disease, 2017, 101(8): 1541.

[5] KLETT P, ROTT P. Inoculum sources for the spread of leaf scald disease of sugarcane caused by *Xanthomonas albilineans* in Guadeloupe [J]. Journal of Phytopathology, 1994, 142(3): 283 - 291.

[6] DAUGROIS J H, BOISNE-NOC R, CHAMPOISEAU P, et al. The revisited infection cycle of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of leaf scald of sugarcane [J]. Functional Plant Science and Biotechnology, 2012, 6(S2): 91 - 97.

[7] 李文凤, 黄应昆. 现代甘蔗病害诊断检测与防控技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012: 133 - 156.

表 3 果实成熟期蛀果率调查(2017 年)

Table 3 Damage rates of fruits in the maturation period in 2017

试验区 Plot	总果数/个 Total fruit	虫果数/个 Wormy fruit	蛀果率/% Damage rate of fruit	蛀果下降率/% Descent rate of wormy fruits
苹果园 Apple orchard	1 000	2	0.20	77.78
梨园 Pear orchard	1 000	20	2.00	74.36
李园 Plum orchard	1 000	98	9.80	57.76
对照区(苹果) Control plot(apple)	1 000	9	0.90	—
对照区(梨) Control plot(pear)	1 000	78	7.80	—
对照区(李) Control plot(plum)	1 000	232	23.20	—

3 结论与讨论

性信息素迷向丝在集中种植不同种类果树(苹果、梨、李)的果园使用时,诱捕器诱蛾量明显减少,迷向效果持续时间长且稳定,迷向效果显著。3 个处理间比较,梨园全年成虫诱捕量最多,达到 3 366.33 头/诱捕器,苹果园最少,说明梨小食心虫具有寄主选择性。

梨小食心虫发生高峰期不会因栽培品种的不同而产生明显变化,具有一致性。

因各种果实成熟期不一致,从成虫诱捕迷向率及对照区成虫诱捕量分析发现,李果实成熟采摘后,本区域梨小食心虫发生量开始减少并趋于稳定,而同时期的梨园和苹果园成虫发生量具有上升趋势,这说明梨小食心虫具有迁移性。

不同种类果园中,处理组蛀果率均明显小于对照组,李果实蛀果率明显高于苹果与梨,究其原因,可能是苹果、梨的套袋措施阻碍了食心虫的为害,另外也可能与果园栽植密度、郁闭程度、果实本身特性有关,主要原因还需要进一步开展试验研究。

事实证明,性信息素迷向技术对果园食心虫具有明显防控作用,是替代化学农药的一项可靠技术,如能够进一步降低生产成本,则有望进行大规模运用,在产生重要的社会与经济效益的同时,更具有良好的生态意义。

参考文献

[1] 陈汉杰. 新编林果病虫害防治手册[M]. 郑州:河南出版集团,中原农民出版社,2006:67.

[2] 朱虹昱,刘伟,崔艮中,等. 苹果蠹蛾迷向防治技术效果初报[J]. 应用昆虫学报,2012,49(1):121-129.

[3] WITZGALL P,STELINSKI L L,GUT L J,et al. Codling moth management and chemical ecology [J]. Annual Review of Entomology,2008,53:503-522.

[4] 翟小伟,刘万学,张桂芬,等. 苹果蠹蛾性信息素的研究和应用进展[J]. 昆虫学报,2009,52(8):907-916.

[5] 魏玉红,罗进仓,周昭旭. 信息素迷向技术防治苹果蠹蛾试验初报[J]. 中国果树,2010(3):48-50.

[6] 张国辉,黄敏,仵均祥,等. 迷向处理对梨小食心虫的防治效果[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2010,30(3):232-234.

[7] 涂洪涛,张金勇,陈汉杰,等. 应用性信息素缓释剂迷向防治桃树梨小食心虫研究[J]. 果树学报,2012,29(2):286-290.

[8] 孙钦航,王伟平. 桃小食心虫预测预报及防治试验研究[J]. 西北林学院学报,1988,3(1):47-54.

[9] 李晓龙,夏国宁,何建川,等. 复合式膏体迷向剂对梨小、桃小食心虫的防控效果[J]. 植物保护,2013,39(6):147-152.

[10] 李晓龙,何建川,夏国宁,等. 膏体迷向剂对苹果园梨小、桃小食心虫防效[J]. 植物保护,2015,41(4):208-211.

[11] LI Xiaolong,GENG Shubao,CHEN Hanjie, et al. Mass trapping of apple leafminer, *Phyllonorycter ringoniella* with sex-pheromone traps in apple orchards[J]. Journal of Asia-Pacific Entomology,2017,20:43-46.

(责任编辑:杨明丽)

(上接 185 页)

[8] LIN Linghong, NTAMBO M S, ROTT P C, et al. Molecular detection and prevalence of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald, in China [J]. Crop Protection, 2018, 109: 17-23.

[9] DAVIS M J, WARMUT C J, ROTT P, et al. Worldwide genetic variations in the sugarcane leaf scald disease pathogen, *Xanthomonas albilineans* [J]. Journal American Society of Sugar Cane Technologists, 1995, 15: 71.

[10] ROTT P, FLEITES L, MARLOW G, et al. Identification of new candidate pathogenicity factors in the xylem-invading pathogen *Xanthomonas albilineans* by transposon mutagenesis

[J]. Molecular Plant-microbe Interactions,2011,24(5):594-605.

[11] TSUSHIMA S, SHINOHARA H, NAKAZATO T, et al. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas albilineans* strains from Okinawa, Japan, through a comparison of the *gyrB* and *rpoD* genes in geographically distinct strains [J]. Journal of Phytopathology, 2006, 154(12): 683-687.

[12] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.

(责任编辑:杨明丽)