

· 中药农业 ·

甘肃省黄芪细菌性叶斑病病原的分离和鉴定[△]吕娇娇¹, 晋玲¹, 王艳^{1,2*}, 张婷¹, 高国香¹

1. 甘肃中医药大学 药学院, 甘肃 兰州 730000;

2. 道地药材国家重点实验室, 北京 100700

[摘要] 目的: 明确甘肃省黄芪细菌性叶斑病的病原。方法: 通过植物病原细菌形态学、生理生化指标测定, 以及 16S rDNA、*rpoB* 和 *rpoD* 基因位点联合构建系统发育树, 对黄芪细菌性叶斑病病原菌进行鉴定。结果: 病原菌在营养琼脂 (NA) 培养基上培养 24 h 后菌落直径为 1~3 mm, 圆形或近圆形, 乳白色、光滑凸起、半透明状、边缘整齐; 革兰染色反应为阴性, 好氧型, 在 10~40 °C 均能生长, 在 pH 为 5.7、6.8 的环境中生长良好, 在 2%、5% NaCl 环境下可生长; 可利用葡萄糖、木糖、甘露糖、柠檬酸盐及硝酸盐; 在代谢活动中可产生酪氨酸酶、过氧化氢酶、苯丙氨酸脱氨酶; 分解色氨酸, 液化明胶; 不产生卵磷脂酶、淀粉水解酶及乙酰甲基甲醇。致病性测定初步验证了黄芪细菌性叶斑病的致病菌; 16S rDNA、*rpoB* 和 *rpoD* 基因序列分析进一步确定引起黄芪细菌性叶斑病的病原菌为绿黄假单胞菌 *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson。结论: 明确了甘肃省黄芪细菌性叶斑病的病原, 为黄芪细菌性叶斑病的有效防治提供参考。

[关键词] 黄芪; 细菌性叶斑病; 病原鉴定**[中图分类号]** R282.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2023)03-0568-06**doi:**10.13313/j.issn.1673-4890.20211105003**Isolation and Identification of Pathogen Causing Bacterial Leaf Spot of *Astragalus membranaceus* in Gansu Province**LYU Jiao-jiao¹, JIN Ling¹, WANG Yan^{1,2*}, ZHANG Ting¹, GAO Guo-xiang¹

1. School of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. State Key Laboratory of Dao-di Herbs, Beijing 100700, China

[Abstract] **Objective:** To identify the pathogen causing bacterial leaf spot of *Astragalus membranaceus* in Gansu province and lay a foundation for the prevention and control of this disease. **Methods:** The pathogen was identified based on the morphological, physiological, and biochemical characteristics and the phylogenetic tree constructed based on 16S rDNA, *rpoB*, and *rpoD*. **Results:** The pathogen colony on NA medium appeared round or nearly round, milky white, smooth, convex, and translucent, with entire margin and the diameter of 1-3 mm. It is an aerobic Gram-negative bacterium which can grow at 10-40 °C, pH 5.7 and 6.8. The pathogen can tolerate 2% and 5% NaCl, while it cannot grow in the medium with 7% or 10% NaCl. It can utilize glucose, xylose, mannose, citrate, and nitrate and produce tyrosinase, catalase, and phenylalanine deaminase. It can decompose tryptophan, liquefy gelatin, and cannot produce lecithinase, starch hydrolase, or acetylmethylcarbinol. The pathogenicity test preliminarily verified the isolated bacterium was the pathogen causing bacterial leaf spot of *A. membranaceus*. The sequence analysis of 16S rDNA, *rpoB*, and *rpoD* further identified the pathogen as *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson. **Conclusion:** This study provides a theoretical basis for the prevention and treatment of bacterial leaf spot of *A. membranaceus*.

[Keywords] *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao; bacterial leaf spot; pathogen identification

[△] **[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (31960004); 中央本级重大增减支项目 (2060302); 中国科学院“西部之光”人才培养引进计划项目; 甘肃省创新基地和人才计划项目; 西北中藏药省部共建协同创新中心开放基金项目 (Xbzzy-2022-02)

* **[通信作者]** 王艳, 副教授, 研究方向: 药用植物保护与微生物开发利用; E-mail: gswangyan101@163.com

蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 为豆科多年生草本植物, 以根入药, 性温, 味甘, 具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌等功效, 是药用价值较高的传统中药材^[1], 主产于我国甘肃、山西、内蒙古、陕西、河北等省份^[2]。其中, 甘肃省产量最大, 约占全国黄芪总产量的50%, 集中栽培于定西周边地区, 年栽培面积约30万亩(1亩 $\approx$ 666.67 m²)^[3]。甘肃省陇西县为全国重要的中药材集散地, 素有“中国药都”“千年药乡”“中国黄芪之乡”的美誉, 该地区种植的黄芪以道地著称^[4]。

近年来, 随着蒙古黄芪人工栽培面积的逐年扩大、黄芪连作生长环境的改变和土壤病原菌数量的不断积累, 病害已成为制约黄芪产量增加和品质提升的重要因素之一。2004年, 骆得功等^[5]对黄芪细菌性叶斑病发病症状进行了报道, 甘肃省黄芪主要病害有13种。调查发现, 甘肃省黄芪细菌性叶斑病日趋严重, 发病率为35.5%~93.0%, 严重度2~4级。本研究旨在通过形态学和多基因位点对该病的病原进行鉴定, 同时提出防治建议, 为黄芪细菌性叶斑病的有效防治及黄芪规范化种植提供参考。

1 材料

1.1 样品

样品于2019年采自甘肃省陇西县首阳镇大田(N36°4'31", E104°27'4"; 海拔为1912 m), 由甘肃中医药大学崔治家教授鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的叶。对具有典型症状的黄芪病株, 描述其症状、拍照后置于自封袋中备用。

1.2 仪器

SW-CJ-1FD型单人单面净化工作台(上海苏净实业有限公司); XB224型电子分析天平(上海精科天美科学仪器有限公司); LDZX-50KBS型立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); SPX-250-GB型光照培养箱(上海佳胜实验设备有限公司); THZ-82型气浴恒温振荡器(常州金坛恒丰仪器制造有限公司); T6新世纪型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); XZ-20T型台式高速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司)。

1.3 试药

牛肉膏(批号: 20190718)、蛋白胨(批号: 20191030)、琼脂(批号: 20191030)均购于北京奥博星生物技术有限责任公司; 其他试剂均为分析纯; 水为超纯水。

2 方法

2.1 病原菌的分离和纯化

按文献[6-7]方法, 剪取黄芪细菌性叶斑病病叶病健交界处组织, 大小为5 mm², 用0.1%升汞表面消毒30 s, 无菌水冲洗3次, 用灭菌的玻璃棒将病斑捣碎, 静置15 min后, 用玻璃棒蘸取少量液体, 采用平板划线法将其接种在营养琼脂(NA)培养基(牛肉膏3 g、蛋白胨7.5 g、葡萄糖10 g、琼脂15 g、水1000 mL, pH为7.0~7.2)上, 置于28℃恒温培养箱中, 48 h后观察菌落生长情况。挑取单菌落进行纯化, 并在4℃冰箱保存备用。

2.2 病原菌的形态鉴定

按文献[8]方法, 在NA平板上划线, 于28℃培养24 h后, 观察菌落形态、大小、颜色、质地并进行描述, 革兰染色法染色观察菌体的大小和形状。

2.3 烟草过敏性反应

按文献[8-9]方法, 待烟草苗长到6~8叶时, 用小号针管(1 mL)吸取配好的新鲜菌悬液(1×10^8 CFU $\cdot$ mL⁻¹) 0.1 mL, 把烟草叶片轻轻反转过来, 用中指拖住烟草叶片的基部, 从叶片背面将菌液慢慢注射到叶肉组织中, 待接种部位出现明显的水渍状为止, 以注射灭菌水为阴性对照, 室内套袋保湿, 使相对湿度达到70%~75%, 置于28℃光照培养箱中培养, 从第6小时开始观察, 每2 h观察1次, 至24 h, 观察有无过敏性坏死反应。

2.4 致病性测定

按文献[10-11]方法, 将分离细菌接种在NA培养基上, 28℃恒温培养24 h, 配制成浓度为 1×10^8 CFU $\cdot$ mL⁻¹的菌悬液, 采用有伤和无伤的方法接种在健康黄芪叶片上。有伤接种: 用70%脱脂棉球擦去叶片表面灰尘, 用无菌针将健康叶片刺伤, 用移液枪吸取菌液10 μ L至伤口, 用无菌水作对照, 室内套袋保湿, 使相对湿度达到70%~75%。无伤接种: 将菌悬液装入喷壶中喷洒在新鲜健康黄芪叶片

上,对照喷洒无菌水,室内套袋保湿,使相对湿度达到70%~75%,将所有植株置于28℃光照培养箱中。每隔6 h观察发病情况并记录。

2.5 生理生化测定

按《常见细菌系统鉴定手册》^[12]方法进行生理生化项目测定。

2.6 16S rDNA、*rpoB*和*rpoD*多基因序列分析

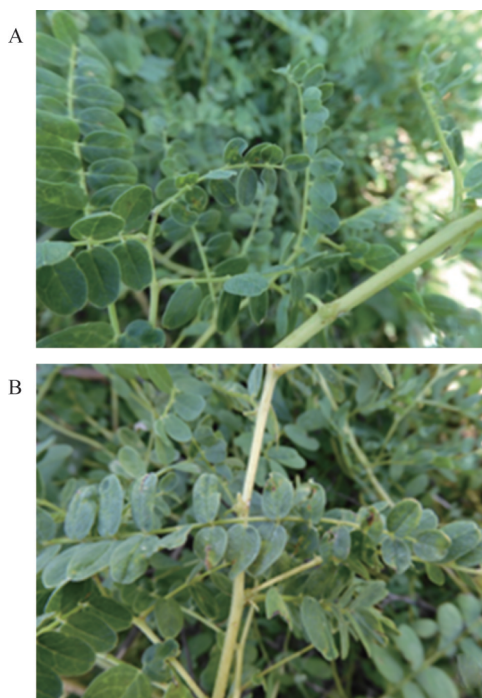
将病原菌转接到NA培养基上培养24 h后,接种环挑取纯化的单菌落悬浮于装有超纯水500 μL的离心管中,沸水浴5 min,然后12 000 r·min⁻¹离心1 min(离心半径为2.5 cm),上清液转移到无菌的1.5 mL离心管中备用,置于-20℃下保存备用。

参考文献[13]报道方法,选择引物27F/1492R、LAPS/LAPS27、PvRpoD1/PvRpoD2(由上海生工生物技术公司合成)分别扩增16S rDNA、*rpoB*、*rpoD*片段。聚合酶链式反应(PCR)体系为25 μL: 2× Mix 混合液12.5 μL,模板DNA 2 μL,上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各1 μL, ddH₂O 8.5 μL。PCR反应条件为95℃预变性5 min; 94℃变性30 s; 退火(16S rDNA、*rpoB*、*rpoD*的退火温度分别为55、61、63℃)30 s; 72℃延长1.5 min, 30次循环; 最后72℃延伸10 min。用1%琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行检测,将PCR扩增产物送至上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。将测序获得的16S rDNA、*rpoB*、*rpoD*基因序列用Seqman软件进行拼接并手工校正后,再与GenBank中相关数据进行同源性分析,分别下载与其同源性最高的序列,用MEGA 7.0软件的“W”功能比对并手工校正后,分别将同一菌株同源性最高的3个基因序列进行联合,使用MEGA 7.0软件的邻接法(NJ)构建系统发育树。

3 结果

3.1 病害症状

如图1所示,该病原主要危害叶片,其次是叶柄。叶片前期多在侧脉产生不规则形、近圆形斑点,褐色至黑褐色,直径2~4 mm,靠近健康组织有明显黄晕。后期多角形病斑明显,微下陷,灰绿色病斑上生有大量黑色小颗粒。此病常与匍柄霉、链格孢混生,症状不易区分。



注: A. 发病前期的田间症状; B. 发病后期的田间症状。

图1 黄芪细菌性叶斑病症状

3.2 病原菌的形态学鉴定

3.2.1 病原菌的分离和纯化 经过分离共获得了10株黄芪病原细菌,标记为HQXJ1~HQXJ10。如图2所示,10株细菌在NA培养基上形态特征基本一致,菌落均为圆形或近圆形,24 h后直径为1~3 mm,乳白色、光滑凸起、半透明状、边缘整齐,选择HQXJ1进行生理生化测定及分子鉴定。



图2 黄芪病原细菌HQXJ1在NA培养基上的菌落形态

3.2.2 革兰染色 采用3%KOH进行试验, HQXJ1~HQXJ10均有拉丝现象。革兰染色后在油镜下观察,如图3所示,菌体均为红色,杆状,革兰反应阴性,菌体大小为2.3~1.7 μm×0.3~0.5 μm。

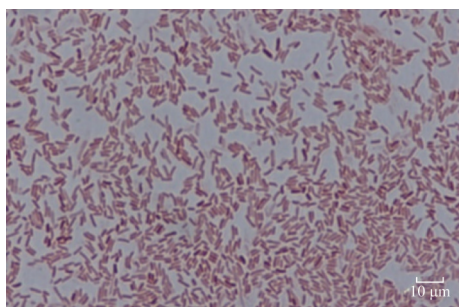


图3 黄芪病原细菌HQXJ1的革兰染色

3.3 烟草过敏性反应

接种HQXJ1~HQXJ10菌株6 h后,在烟草叶针孔处均出现斑点,斑点较小;8 h后斑块明显,褐色,近健康组织有明显黄晕;10 h后褐色斑块仍存在且不再变大(图4)。初步判断HQXJ1~HQXJ10为黄芪细菌性叶斑病的致病菌。



注:左侧为接种菌液;右侧为对照;箭头指向斑块。

图4 HQXJ1烟草过敏性反应

3.4 致病性测定

将HQXJ1~HQXJ10的菌悬液分别通过有伤和无伤的方法接种在健康黄芪叶片上,接种后6 h发现,用针刺方法接种的黄芪叶片上的针刺部位出现了淡褐色的坏死病斑,对照仅有针刺的伤口;用喷洒方法接种的黄芪在叶片上没有明显的症状表现,对照也没有任何症状出现。这说明用针刺处理的致病效果比喷雾更好。12 h出现明显的褐色小病斑,说明有致病作用,进一步验证了HQXJ1~HQXJ10为黄芪细菌性叶斑病的致病菌。

3.5 生理生化测定

黄芪细菌HQXJ1的生理生化测定结果见表1。HQXJ1在10~40℃能生长,在pH为5.7、6.8的环境中生长良好,在含2%、5% NaCl的环境下可生长,在含7%、10% NaCl的环境下不可生长;可利

用葡萄糖、木糖、甘露糖、柠檬酸盐及硝酸盐;在代谢活动中可以产生酪氨酸酶、过氧化氢酶、苯丙氨酸脱氨酶;分解色氨酸、葡萄糖;液化明胶;不产生卵磷脂酶、淀粉水解酶及乙酰甲基甲醇;为好氧型细菌。

3.6 16S rDNA、*rpoB*和*rpoD*多基因序列分析

菌株HQXJ1的16S rDNA、*rpoB*、*rpoD*测序获得全长序列分别为1338、1081、657 bp(登录号正在提交)。如图5所示,将3对拼接好的序列进行多基因序列联合,构建系统发育树,结果表明,该菌与已登录的菌株号ATCC13223 *Pseudomonas viridiflava*同源率为100%。

综合上述形态学、生理生化指标和基因序列分析结果,将甘肃省黄芪细菌性叶斑病的病原菌鉴定为绿黄假单胞菌 *Pseudomonas viridiflava*。

4 讨论

本研究从症状观察、病原菌形态、革兰染色,烟草过敏反应、生理生化测定、致病性测定,以及16S rDNA、*rpoB*和*rpoD*多基因序列分析,将分离得到的病原菌菌株HQXJ1鉴定为绿黄假单胞菌 *P. viridiflava*。通过查阅相关资料,该菌株在国外报道较多,可寄生或腐生于不同科属植物上,在拟南芥、紫花苜蓿等牧草及番茄、西瓜、茄子等作物上均分离到该菌,并已开展了生理生化特性与寄生范围等研究^[13-16]。在国内,胡方平等^[17]报道了绿黄假单胞菌能引起猕猴桃花腐病。之后相继出现该菌引起黄瓜细菌性白枯病^[18]、菊苣根腐病^[19]、防风叶枯病^[20]、白菜叶斑病^[21]的报道。本研究报道绿黄假单胞菌引起黄芪细菌性叶斑病。

近年来,黄芪细菌性叶斑病呈逐年增加的趋势,现对有关该病的流行规律和防治技术提出以下防治措施:1)通过降低病情基数、减小田间小气候湿度等生态调控措施控制病害发生蔓延,在发病初期摘除病叶、合理密植、保持田间通风透光良好,提倡晴天上午浇水、适当减少大田漫灌次数;2)平作地常大水漫灌,积水时间长,易导致发病,将平作改为垄作,可有效减缓病情的扩展;3)发病初期摘除病叶结合喷施高效的杀菌剂,如50%托布津可湿性粉剂800倍液、50%代森铵600倍液等,也可以降低病情基数,建议每7~10 d防治1次,连续防治2~3次为宜。

表 1 HQXJ1、标准菌株和对照的生理生化指标测定结果

组别	生长温度/℃						pH				耐盐性试验				糖醇发酵试验			淀粉水解	明胶液化	硝酸盐还原实验	柠檬酸盐利用实验	V-P 测定	接触酶试验	苯丙氨酸脱氨酶试验	酪氨酸水解实验	甲基红试验	吲哚试验	卵磷脂酶试验	厌氧试验
	4	10	30	40	50	55	65	7.6	8	9	2% NaCl	5% NaCl	7% NaCl	10% NaCl	木糖	葡萄糖	甘露醇												
	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+												
HQXJ1	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
标准菌株	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
对照	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注：+ 表示反应为阳性；- 表示反应为阴性；卵磷脂酶试验中细菌不能在培养基上生长。

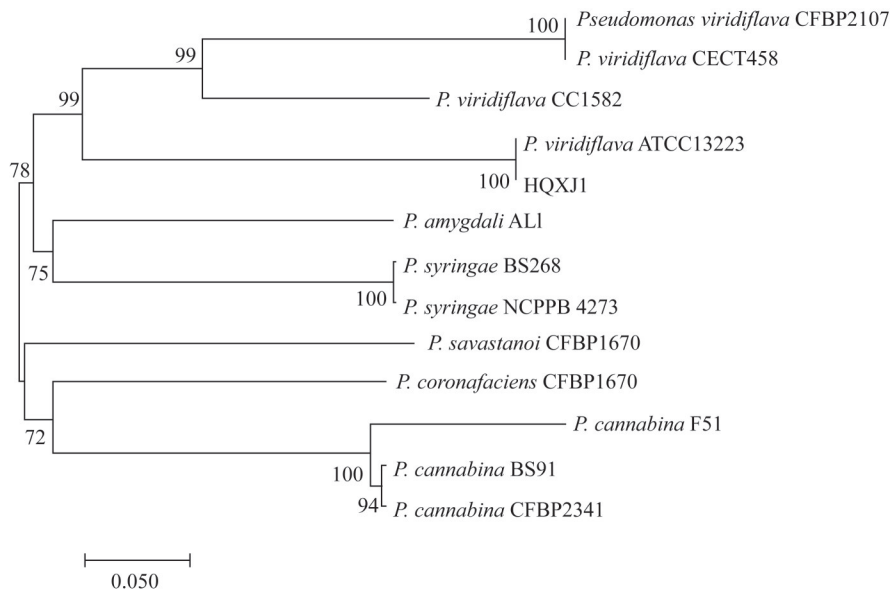


图 5 HQXJ1 的 16S rDNA、rpoB、rpoD 基因联合的系统发育树

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:315.

[2] 秦雪梅,李震宇,孙海峰,等. 我国黄芪药材资源现状与分析[J]. 中国中药杂志,2013,38(19):3234-3238.

[3] 崔建军,董生健. 黄芪秋季栽培技术[J]. 农村新技术,2020(8):11-12.

[4] 王志飞. 黄芪根瘤象发生规律及防治技术研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2013.

[5] 骆得功,韩相鹏,邓成贵,等. 定西市药用黄芪病害调查与病原鉴定[J]. 甘肃农业科技,2004(1):38-40.

[6] 余磊,秦西云,杜静,等. 云南烟草上 1 种新的细菌性病害病原鉴定[J]. 植物病理学报,2009,39(3):243-248.

[7] 严玉宁,何红,叶艺俊,等. 香蕉叶鞘腐败病病原鉴定[J]. 植物病理学报,2011,41(2):124-130.

[8] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,2001.

[9] 吕祝邦,李敏权,惠娜娜,等. 甘肃省定西市当归“水烂病”病原鉴定及致病性测定[J]. 植物保护,2013,39(2):45-49.

[10] 柳凤,杨顺锦,詹儒林,等. 澳洲坚果叶斑病病原鉴定及其生物学特性[J]. 植物保护学报,2011,38(5):437-442.

[11] 姬广海,方敦煌,殷端,等. 香料烟细菌性斑点病病原鉴定[J]. 植物病理学报,2007,37(3):232-236.

[12] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.

[13] LUKEZIC F L. Pseudomonas viridiflava associated with root and crown rot of alfalfa and wilt of birdsfoot trefoil[J]. Plant Dis, 1983, 67(7): 808-811.

[14] ARAKI H, TIAN D, GOSS E, et al. Presence/absence polymorphism for alternative pathogenicity islands in Pseudomonas viridiflava, a pathogen of Arabidopsis[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2006, 103(15): 5887-5892.

[15] AYSAN Y, YILDIZ N, YUCELC F. Identification of Pseudomonas viridiflava on tomato by traditional methods and enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Phytoparasitica, 2004, 32(2): 146-153.

[16] GOUMANS D E, CHATZAKI A K. Characterization and host range evaluation of Pseudomonas viridiflava from melon, blite, tomato, Chrysanthemum and eggplant[J].

- Eur J Plant Pathol, 1998, 104(2): 181-188.
- [17] 胡方平,方敦煌,谢联辉. 中国猕猴桃细菌性花腐病菌的鉴定[J]. 植物病理学报,1998,28(2):80-86.
- [18] 刘长远,赵奎华,傅俊范,等. 黄瓜细菌性白枯病CU-PV 07菌株鉴定及16S rDNA序列分析[J]. 沈阳农业大学学报,2008,39(6):682-685.
- [19] 高文娜,周琦,李子龙. 菊苣上绿黄假单胞菌的分离与鉴定[C]//中国植物病理学会. 中国植物病理学会2011年学术年会论文集. 北京:中国农业科学技术出版社,2011:270.
- [20] WANG Y, ZENG C Y, CHEN X R, et al. First report of leaf blight on *Saposhnikovia divaricata* by *Pseudomonas viridiflava* in Gansu, China[J]. Plant Dis, 2015, 99(2): 281-281.
- [21] 孔宪迪. 大白菜叶斑病病原菌鉴定及抗性鉴定方法[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2018.

(收稿日期: 2021-11-05 编辑: 戴玮)