

引用格式:

罗旭钊, 朱韬, 郝晨星, 朱亦赤, 马先锋, 邓子牛, 韩健. 湖南柑橘溃疡病菌的多态性鉴定及致病力分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(6): 691–698.

LUO X Z, ZHU T, HAO C X, ZHU Y C, MA X F, DENG Z N, HAN J. Polymorphism and pathogenicity analysis of citrus canker pathogens in Hunan[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2022, 48(6): 691–698.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



湖南柑橘溃疡病菌的多态性鉴定及致病力分析

罗旭钊^{1,2}, 朱韬^{1,2}, 郝晨星^{1,2}, 朱亦赤^{1,2}, 马先锋^{1,2}, 邓子牛^{1,2}, 韩健^{3*}

(1.园艺作物种质创新与新品种选育教育部工程中心, 湖南 长沙 410128; 2.国家柑橘改良中心长沙分中心, 湖南长沙 410128; 3.湖南省园艺研究所, 湖南长沙 410125)

摘要: 采集湖南省 6 个柑橘产区的呈现典型溃疡病症状的柑橘叶片、枝条或果实样品 26 份, 分离溃疡病菌株, 采用柑橘溃疡病特异性引物鉴定、细菌保守的 16S rDNA 序列分析及重复序列 PCR 基因指纹分析(Rep-PCR)方法, 分析具有地域代表性的 12 个菌株间基因组多态性。结果显示, 12 个菌株在 BOX-PCR 和 ERIC-PCR 中扩增出相同数量的多态性条带, 无法通过 Rep-PCR 对菌株进行区分; 串联重复位点多态性分析表明, CCB-2、CCB-3 和 CCB-10 这 3 个菌株在 GT1 位点上出现片段大小多态性; 通过活体注射接种方式, 将 12 个溃疡病菌株接种至冰糖橙叶片, 结果 CCB-2 和 CCB-4 菌株表现出较稳定致病力, 综合病情指数达到 75%以上, 表明 CCB-2 相比其他 11 个菌株可能在基因组序列水平存在多态性, 且影响菌株的致病力水平。

关键词: 柑橘; 柑橘溃疡病; 多态性; 致病力; 湖南

中图分类号: S436.661⁺2

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2022)06-0691-08

Polymorphism and pathogenicity analysis of citrus canker pathogens in Hunan

LUO Xuzhao^{1,2}, ZHU Tao^{1,2}, HAO Chenxing^{1,2}, ZHU Yichi^{1,2}, MA Xianfeng^{1,2}, DENG Ziniu^{1,2}, HAN Jian^{3*}

(1.Engineering Research Center for Horticultural Crop Germplasm Creation and New Variety Breeding, Changsha, Hunan 410128, China; 2.National Center for Citrus Improvement, Changsha, Hunan 410128, China; 3.Hunan Horticultural Research Institute, Changsha, Hunan 410125, China)

Abstract: Twenty-six citrus leaf, branch or fruit samples showing typical symptoms caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) were collected from six citrus producing areas in Hunan Province, and the citrus canker pathogen strains were isolated. Genomic polymorphisms among 12 geographically representative pathogen strains were analyzed by bacterial conserved 16S rDNA sequence analysis and repetitive sequence PCR gene fingerprinting (Rep-PCR) methods using citrus canker-specific primer. The results showed that the 12 strains showed the same number of polymorphic bands in BOX-PCR and ERIC-PCR and could not be distinguished by Rep-PCR, while tandem repeat polymorphism analysis showed that 3 strains, strain CCB-2, strain CCB-3 and strain CCB-10, showed fragment size polymorphism at the GT1 locus. Twelve strains of citrus canker were inoculated by in vivo injection into the leaves of 'Bingtang' sweet orange and two strains, strain CCB-2 and strain CCB-4, showed stable pathogenicity with a combined disease index of over 75%, indicating that strain CCB-2 may have polymorphism at the genomic sequence level compared to the other 11 strains and affect the pathogenicity level of the strain.

收稿日期: 2022-02-26

修回日期: 2022-06-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31720103915); 湖南省自然科学基金项目(2020JJ4040); 湖南省科学技术厅湖湘高层次人才聚集工程项目(2019RS1052); 湖南省教育厅研究生科研创新项目(CX20200665)

作者简介: 罗旭钊(1997—), 男, 湖南新邵人, 硕士研究生, 主要从事果树遗传与育种研究, luoxuzhao@126.com; *通信作者, 韩健, 硕士, 助理研究员, 主要从事柑橘育种和病虫害防治研究, hanjian1020@163.com

Keywords: *Citrus*; citrus canker; polymorphism; pathogenicity; Hunan

柑橘溃疡病是由柑橘黄单胞杆菌柑橘亚种(*Xanthomonas citri* subsp. *citri*)引起的柑橘毁灭性病害^[1-2], 湖南、湖北、广东、广西、四川、重庆、江苏和浙江等产区时有发生。根据病原菌的寄主范围、致病症状、噬菌体分型、DNA 指纹和地理分布的不同, 柑橘溃疡病菌被分为 A、B、C、D 和 E 菌系^[3]等 5 种细菌形式或病原体类型, 其中 A 菌系是传播范围最广、侵染力最强的致病型^[4]。目前已知的 2 种 A 菌系的变种 A*和 A^w, 寄主范围仅限于墨西哥来檬(*Citrus aurantifolia*)、塔西提来檬(*C. latifolia*)和阿来檬(*C. macrophylla*), 可通过扩增片段长度多态性(AFLP)在亚属水平上进行区分^[5]。B、C 菌系被认为是 A 菌系的减毒类型^[6]。由于细菌基因组中限制性内切酶的酶切位点分布是独特、稳定、可克隆遗传的, 柑橘溃疡病菌株的限制性片段长度多态性(RFLP)可用来区分 B、C、D 菌系和 A、E 菌系^[7]。

杨贵兵^[8]对湘南、湘西、湘中、湘北共 89 个果园进行调查, 发现多数果园全年未喷施溃疡病的防治药剂, 各产区呈现不同的感病程度。感染柑橘溃疡病的果实症状在后期与柑橘疮痂病非常类似, 容易混淆^[9], 因此, 对柑橘溃疡病田间症状观察鉴定的结果只能视作是初步结果, 必须结合溃疡病菌系特异引物鉴定以及细菌 16S 测序才能对其进行判定。HARTUNG 等^[10]基于柑橘溃疡病菌 *BamH* I 限制性片段设计引物 pFL1, 用于常规 PCR 鉴定, 能够扩增出溃疡病菌 A 菌系及其 2 个近缘种。王中康等^[11]设计的特异性引物 JYF5 和 JYR5, 具备良好的特异性和灵敏度。胡春华^[12]根据 *pthA* 致病基因末端的 3 个核定位序列设计的 P8/P9 能够特异性检测柑橘溃疡病菌。

细菌基因组中广泛存在着高度保守的串联重复序列, Rep-PCR(REP)DNA 指纹技术就是基于这些串联重复序列在不同菌株中的多态性来区分不同菌株^[13]。CUBERO 等^[14]和 GRAHAM 等^[15]利用 ERIC-PCR 发现 A 菌系可以扩增出 375 bp 的 *Irp* 基因序列, 该基因序列可用来区分 A 菌系和 *Xanthomonas* 属的其他细菌; 姚廷山等^[16]同样通过 Rep-PCR 技术分析出 9 个省份的柑橘溃疡病菌具

有丰富的多样性; 李文婷等^[17]通过比对分析 8 个柑橘溃疡病菌全基因组序列的串联重复位点(Short Tandem Repeat, STR), 筛选出 6 个高度变异位点, 利用这些位点对广东省 15 个市(县)14 个品种共 352 个柑橘溃疡病菌菌株进行遗传多样性分析, 发现基于遗传多样性和遗传距离对广东省不同地区的柑橘溃疡病菌株鉴定出 6 组类群, 且同一地理来源或地理来源相邻的菌株聚为一类, 表明菌株的遗传变异与所处的环境以及气候条件存在一定的相关性。

湖南省不同柑橘产区感染柑橘溃疡病后表现出差异^[18]。笔者对湖南 6 个柑橘产区枝、叶、果实的溃疡病菌进行分离和鉴定, 利用 Rep-PCR 技术分析各菌株基因组中串联重复序列的多样性, 并将柑橘溃疡病菌接种至活体的冰糖橙叶片上, 比较各分离菌株致病力的强弱, 以期对柑橘溃疡病的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

分别于 2019 年 6 月和 2020 年 9 月从湖南省株洲市、娄底市、永州市、郴州市、怀化市和邵阳市等柑橘产区采集感染柑橘溃疡病的冰糖橙的枝条、叶片、果实样品共 26 份, 其中株洲市、娄底市、邵阳市、怀化市各 1 份, 永州市 12 份, 郴州市 10 份。

XacDL-509 和 DL-509-GFP 菌株由国家柑橘改良中心长沙分中心保存^[19]; *pthA4* 突变菌株 Xcc049A 由上海交通大学陈功友教授团队惠赠。

1.2 方法

1.2.1 湖南柑橘溃疡病病原菌的分离与鉴定

采用稀释分离法^[20]分离冰糖橙枝条、叶片和果实中的病原菌; 以纯化后的菌液为模板, 采用胡春华^[12]设计的 P8/P9 和王中康等^[11]设计的 JYF5/JYR5 柑橘溃疡病菌特异性引物(表 1)对菌株进行溃疡病常规 PCR 鉴定; 采用 HARTUNG 等^[21]设计的 pFL1 引物对鉴定菌株是否属于 A 菌系。菌株 16S rDNA 的扩增采用 WEISBURG 等^[22]设计的

引物 fD1/rP2, 利用 NCBI BLAST 将 16S rDNA 扩增测序结果进行数据库检索与比对。

表 1 试验所用引物信息

Table 1 Information of primers used in this experiment			
用途	引物名称	序列(5'-3')	目的片段长度/ bp
溃疡病菌鉴定	P8	gtgccagttatctcgcctgac	870
	P9	ccaatccctgccgacgctcaggtag	
	JYF5	ttcggcgcaacaacctg	413
	JYR5	aactccagcacatagggtc	
	fD1	ccgaattcgtcgacaacagagttgatcctggctcag	
16S 扩增	rP2	ccgggatccaagcttacggctacctgttagcact	1540
	PFL1-2	gcacgggtgcaaaaaatct	222
Rep-PCR	PFL1-3	ttggtgctgctgctgtat	
	BOX 1AR	ctacgcaaggcgcgctgacg	800~6000
	ERIC1	atgtaagctctggggattcac	300~6000
STR 位点多态性	ERIC2	aagtaagtgactgggtgagcg	100~2000
	GT1-F	ttgccaggccagggtcgc	
	GT1-R	gccagatgctcgatcaagg	
	GT3-F	tcggcgagttcgatcggtgct	100~2000
	GT3-R	ctggcgtgctgcaggatgt	

1.2.2 湖南柑橘溃疡病菌株 Rep-PCR 及 STR 位点多态性分析

参照 HARTUNG 等^[21]的方法, 采用 BOX 1AR 和 ERIC1/ERIC2 引物对鉴定出的溃疡病菌株的 DNA 进行多态性分析, 并基于李文婷等^[17]的研究, 挑选遗传多态性较丰富的 GT1、GT3 位点引物对鉴定的菌株 DNA 进行多态性分析。

1.2.3 湖南柑橘溃疡病菌株的致病力测定

将分离鉴定后的溃疡病菌株重新激活, 挑选冰糖橙上即将达到最大叶面积且尚未转绿的嫩叶背面进行活体注射接种, 每个菌株进行 3 次生物学重复, 并以等浓度的黄单胞杆菌属的水稻白叶枯病原菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)作为非致病菌对照。接种后, 观察记录第 7、10、14、20 和 45 天的症状; 参照李建挥^[23]采用病情指数的统计方法, 在接种后第 45 天测量接种区域典型病斑(火山口状或愈伤状突起、周围有明显黄色晕圈)直径, 不规则形状的病斑则取长径与短径的平均值, 重复 3 次, 根据病情指数比较菌株的致病力差异。

2 结果与分析

2.1 湖南柑橘溃疡病致病菌的鉴定结果

从湖南柑橘产区采集的感染溃疡病的冰糖橙病叶症状存在差异, 采集自永州市的病叶上的单个病斑面积较大, 病斑周围的黄绿色晕圈范围也较广(图 1-1); 而采集自郴州市宜章县的病叶上单个病斑面积较小, 黄绿色晕圈不明显(图 1-2); 采集自邵阳市的病叶单个病斑木栓化程度较为严重(图 1-3)。根据症状差异, 挑选出 12 个菌株进行后续试验, 分别命名为 CCB-1、CCB-2、CCB-3、CCB-4、CCB-5、CCB-6、CCB-7、CCB-8、CCB-9、CCB-10、CCB-11 以及 CCB-12, 其中 CCB-1 来源于株洲, CCB-2 来源于娄底, CCB-3、CCB-5、CCB-6、CCB-7、CCB-8 来源于郴州, CCB-9 来源于邵阳, CCB-4、CCB-10、CCB-11、CCB-12 来源于永州。对病斑周围的黄绿色晕圈进行组织分离, 梯度稀释后, 在 LB 固体培养基上分离培养, 12 个菌株与 3 个对照菌株相比, 单菌落特征一致, 在 LB 固体平板上生长速率也基本一致(图 2)。

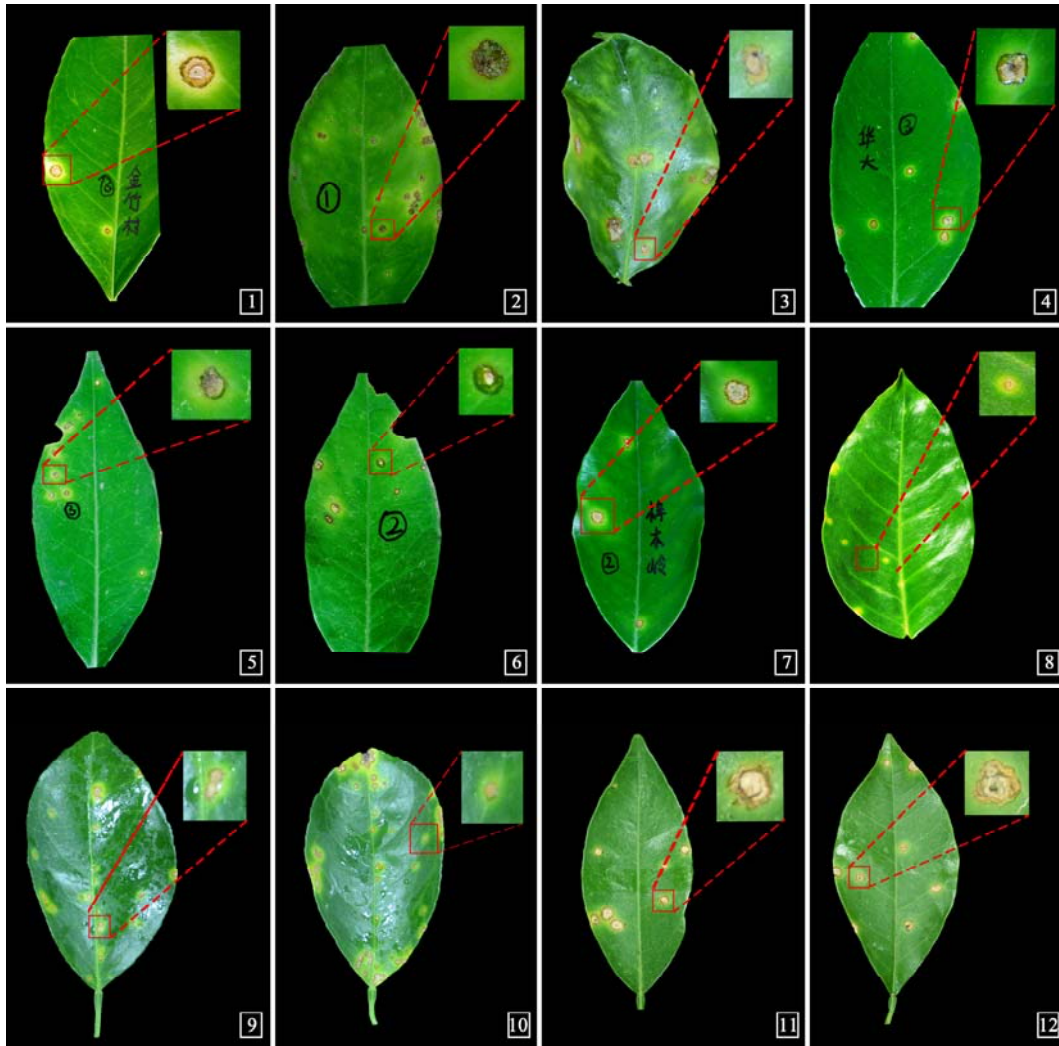
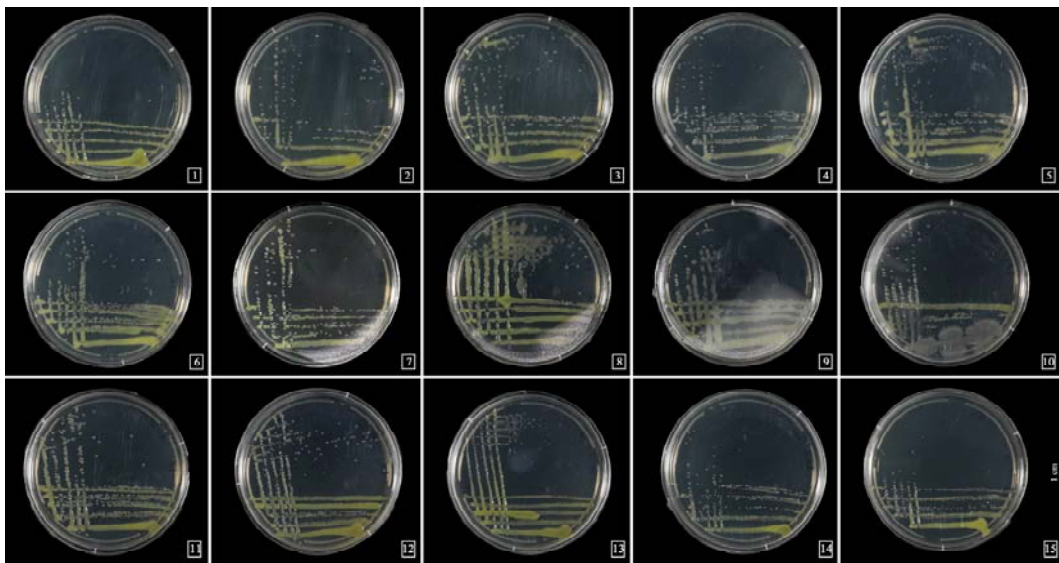


图 1 湖南冰糖橙溃疡病叶片发病症状

Fig.1 Symptoms of 'Bingtang' sweet orange's leaves infected with *Xcc* from Hunan

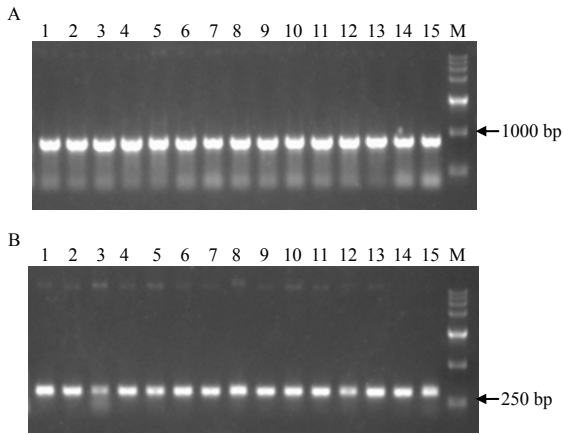


1~12 溃疡病致病菌株; 13 *XacDL-509*; 14 *Xcc049A*; 15 *DL-509-GFP*。

图 2 湖南柑橘溃疡病菌菌株的单菌落特征

Fig.2 Single colony features of the isolated citrus canker pathogen strains in Hunan

以纯化后的菌液为模板进行 PCR 扩增，产物通过 1%的琼脂糖凝胶电泳检测，结果显示，各菌株扩增片段大小与引物 P8/P9 和 JYF5/JYF5R 预期目的片段大小相吻合，条带清晰完整，表明分离的菌株均为柑橘溃疡病菌(图 3)。利用 PFL1-2 和 PFL1-3 引物对菌株进行菌系鉴定，琼脂糖凝胶电泳检测结果显示，12 个菌株均为溃疡病 A 菌系(图 4)。



A P8/P9 引物鉴定结果; B JYF5/JYF5R 引物鉴定结果。
1~12 溃疡病致病菌株; 13 XacDL-509; 14 Xcc049A; 15 DL-509-GFP。

图 3 湖南柑橘溃疡病菌特异性引物鉴定结果

Fig.3 Identification of citrus canker pathogen in Hunan using specific primers

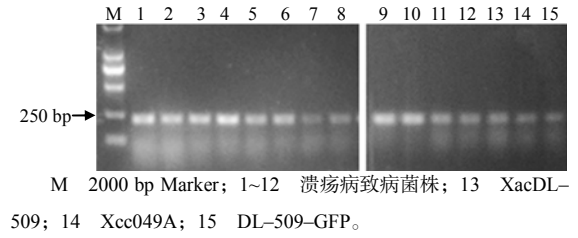


图 4 湖南柑橘溃疡病菌系鉴定

Fig.4 Identification of citrus canker pathogen strain in Hunan

利用细菌 16S rDNA 通用引物 fD1/rP2 对分离的菌株和 3 个对照菌株进行 PCR 扩增，将扩增片段连接至改造的 pYL-T 克隆载体并测序，利用 NCBI 基因组数据库检索与各菌株 16S rDNA 序列相似性较高的细菌基因组序列，结果(图 5)显示，分离的 12 个菌株的 16S rDNA 与柑橘溃疡病菌的 16S rDNA 均高度相似，表明分离的 12 个菌株均为柑橘溃疡病菌(表 2)。

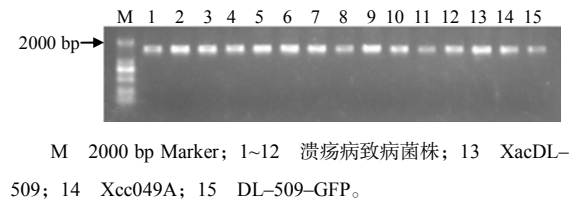


图 5 湖南省柑橘溃疡病菌株 16S rDNA 扩增结果

Fig.5 Amplification results of Xcc 16S rDNA of citrus canker pathogen strain in Hunan

表 2 湖南省柑橘溃疡病菌 16S rDNA 序列比对结果

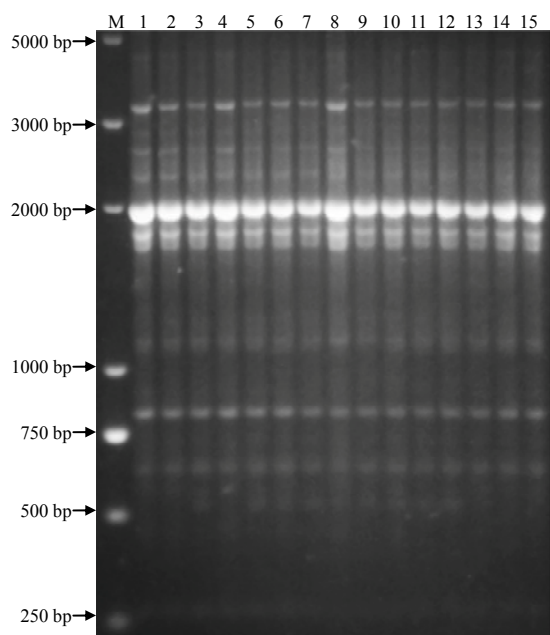
Table 2 The results of 16S rDNA sequence alignment for citrus canker pathogen strains in Hunan

菌株	匹配菌株	相似性/%	序列编号
CCB-1	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>glycines</i>	100.00	CP026334.1
CCB-2	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>glycines</i>	100.00	CP026334.1
CCB-3	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>glycines</i>	100.00	CP026334.1
CCB-4	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>glycines</i>	100.00	CP026334.1
CCB-5	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>glycines</i>	100.00	CP026334.1
CCB-6	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>punicae</i>	100.00	CP030178.1
CCB-7	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>punicae</i>	100.00	CP030178.1
CCB-8	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>punicae</i>	100.00	CP030178.1
CCB-9	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>punicae</i>	100.00	CP030178.1
CCB-10	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>punicae</i>	99.89	CP030178.1
CCB-11	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>glycines</i>	99.50	CP026334.1
CCB-12	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>punicae</i>	99.80	CP030178.1
XacDL-509	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>punicae</i>	100.00	CP030178.1
Xcc049A	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	100.00	MT328603.1
DL-509-GFP	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>punicae</i>	100.00	CP030178.1

2.2 基于 Rep-PCR 的湖南柑橘溃疡病菌株多态性

以 12 个菌株的菌液为模板分别进行 Rep-PCR 扩增，产物琼脂糖凝胶电泳结果显示，BOX-PCR 的扩增效率较高，共扩增出 9 条目的条带，片段

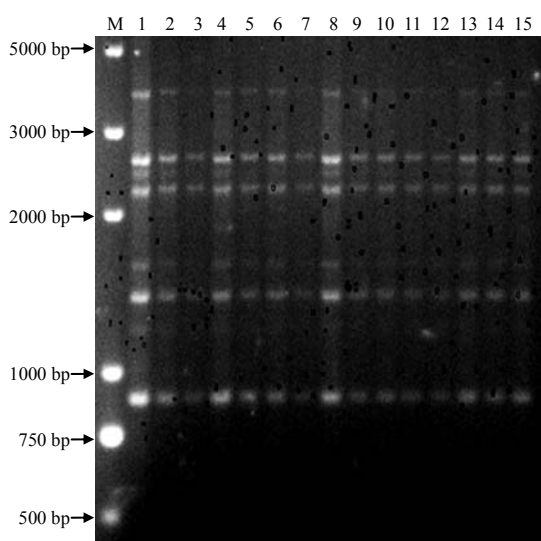
大小集中于 500~5000 bp(图 6)，而 ERIC-PCR 的扩增效率较低，但分辨率更高，共扩增出 7 条目的条带，片段大小集中于 750~5000 bp(图 7)。Rep-PCR 结果表明，各菌株之间没有明显的多态性。



M 5000 bp Marker; 1~12 溃疡病致病菌株; 13 XacDL-509; 14 Xcc049A; 15 DL-509-GFP。

图6 湖南柑橘溃疡病菌株 BOX-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.6 BOX-PCR analysis of the isolated strains with agarose gel detection



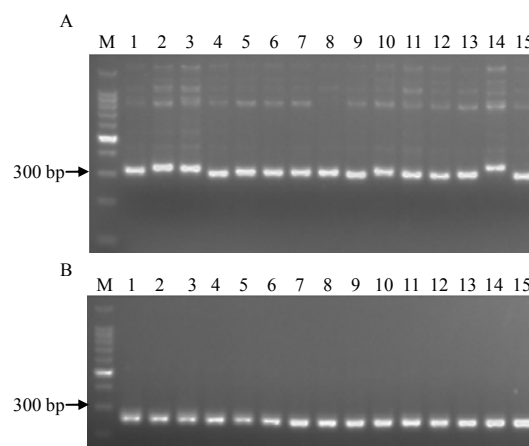
M 5000 bp Marker; 1~12 溃疡病致病菌株; 13 XacDL-509; 14 Xcc049A; 15 DL-509-GFP。

图7 湖南柑橘溃疡病菌株 Eric-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.7 Eric-PCR analysis of Hunan citrus canker pathogen strains with agarose gel detection

利用已筛选到的2个具有高度多态性STR位点引物对12个溃疡病菌株进行多态性鉴定。GT1多态性位点验证结果显示,CCB-2、CCB-3、CCB-10在300 bp左右的位置出现片段大小多态性(图8-

A),而在GT3位点上未表现出多态性(图8-B)。



A GT1 引物扩增结果; B GT3 引物扩增结果; 1~12 溃疡病致病菌株; 13 XacDL-509; 14 Xcc049A; 15 DL-509-GFP。

图8 湖南柑橘溃疡病菌株 GT1/GT3 引物扩增结果

Fig.8 Amplification results for citrus canker pathogen strains from Hunan using primers specific for GT1 and GT3

2.3 湖南柑橘溃疡病致病菌株的致病力

接种20 d后,不同菌株致病症状有差异。接种CCB-1的区域在第20天基本不表现症状(图9-1),仅在局部区域形成少量的针孔大小的油渍状斑点,未形成典型的火山口病斑凸起,与缺失*pthA4*致病效应子的Xcc049A表现的症状类似,而接种其他菌株的区域均出现典型病斑(图9-2和图9-3)。此外,接种CCB-4的区域病斑数量较多,病斑形成的速率较快且症状稳定。通过统计各菌株接种区域病斑大小,计算病情指数,综合评价的结果显示CCB-2、CCB-4与CCB-13菌株致病力明显优于其他菌株(表3)。

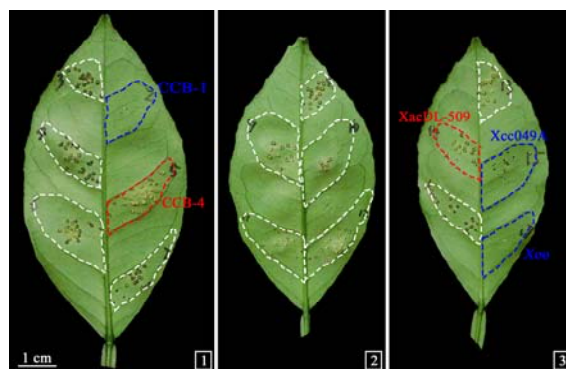


图9 冰糖橙叶片活体注射接种溃疡病致病菌株后第20天症状

Fig.9 The symptoms on the 20th day after in vivo inoculation of 'Bingtang' sweet orange's leaves with strains of citrus canker pathogen from Hunan

表 3 冰糖橙叶片活体注射接种溃疡病致病菌株的病情指数

Table 3 Statistical analysis of disease index on 'Bingtang' sweet orange's leaves inoculated in vivo with different pathogen strains

菌株编号	病斑数量	病斑直径/mm	病情指数
CCB-1	5	(0.75±0.19)g	45.00
CCB-2	13	(1.54±0.11)b	84.62
CCB-3	18	(1.13±0.09)cdef	58.89
CCB-4	18	(1.69±0.12)a	91.11
CCB-5	17	(0.96±0.07)defg	48.24
CCB-6	17	(0.94±0.09)defg	43.53
CCB-7	19	(1.16±0.07)cde	66.32
CCB-8	17	(1.24±0.07)cd	69.41
CCB-9	10	(0.98±0.15)defg	52.00
CCB-10	16	(1.11±0.07)cdef	55.00
CCB-11	25	(0.98±0.05)defg	47.20
CCB-12	14	(1.18±0.07)cde	62.86
XacDL-509	14	(1.39±0.09)bc	78.46
Xcc049A	12	(0.83±0.09)fg	36.67
DL-509-GFP	18	(0.92±0.06)efg	46.67

同列不同字母表示菌株间的差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

湖南柑橘栽培历史悠久, 品种资源丰富, 但抗柑橘溃疡病的种质资源极其稀少, 柑橘产区受溃疡病为害严重, 已有 65 个县(市)发病, 疫区县(市)占全省总县(市)的 57.5%, 甜橙和柚发病果园占 43%^[2], 且不同产区受害程度不同, 推测不同产区对柑橘溃疡病的耐感性差异可能是由于菌系多态性导致。基于本研究中柑橘溃疡病特异性引物鉴定, 湖南不同柑橘产区的柑橘溃疡病菌均为致病力最强的 A 菌系, 且细菌保守的 16S rDNA 序列分析结果表明各产区柑橘溃疡病菌多态性较为单一, 各产区感病程度的差异可能更多地与各地防治手段有关^[18]。田间调查中观察到各柑橘产区不同柑橘品种感染溃疡病的症状不尽相同^[24]。潘贞珍观察了‘滑皮金柑’‘建阳橘柚’和‘沃柑’3 个品种的叶片结构, 测定了叶片生化物质含量及其与柑橘溃疡病感病程度的相关性, 发现这 3 个品种的叶片气孔密度与柑橘溃疡病感病程度呈极显著正相关, 气孔面积与柑橘溃疡病感病程度呈显著正相关, 叶片厚度、栅栏组织厚度、海绵组织厚度、上表皮厚度、下表皮厚度、蜡质含量等与柑橘溃疡病感病程度均呈极显著负相关^[25], 为不同柑橘

品种对柑橘溃疡病的抗感性差异给出了初步解释。而笔者所收集的不同产区病叶虽为同一品种, 但叶龄不一致, 导致同一品种叶片结构发生变化, 也可能导致发病症状的不同。

采集自湖南不同柑橘产区的冰糖橙溃疡病叶片症状有差异, 通过叶片组织分离法获得的溃疡病菌单个菌落的特征一致, 且采用柑橘溃疡病特异引物 P8/P9 和 JYF5/JYF5R 鉴定的结果表明这些叶片的症状均是由溃疡病菌引起, 但冰糖橙叶片活体注射接种分离鉴定的菌株后, 在叶片上形成的症状和病斑特征存在差异。这可能是由于来自不同产区的溃疡病菌系不同或者同一菌系的多态性有差异, 导致各菌株的致病力不同, 注射接种冰糖橙叶片后叶片表现的症状不同。徐磊^[26]对不同产地的柑橘溃疡病菌株进行鉴定时发现, 柑橘溃疡病菌存在严重的小种分化情况, 且 Eric-PCR 的分辨率较 Box-PCR 更高, 本试验结果与其研究结果一致。活体注射接种菌株至冰糖橙叶片, CCB-2、CCB-4 引起的症状稳定, 但 CCB-2、CCB-3、CCB-10 在 GT1 位点上表现出同样的多态性条带, 可能表明 STR 位点上缺失或插入重复单元并不影响菌株致病力。

ABE 等^[27]研究发现, 2 个或 2 个以上 *pthA* 基因的缺失比单个缺失更能显著降低柑橘溃疡病菌在植物中的生长繁殖, 表明 *pthA* 基因在柑橘溃疡病菌致病性和适应能力上具有叠加作用, 这种叠加作用与感病基因中效应子结合原件(effector-binding elements)的核苷酸多态性有关。*PthA4* 作为溃疡病菌的致病效应子, 在溃疡病菌侵染植株形成典型病斑的过程中起到至关重要的作用^[28], 且 *pthA* 表达水平与柑橘溃疡病菌的致病力呈正相关^[29]。从对照菌株 Xcc049A(*pthA4* 缺失菌株)的致病表型可以看出, 溃疡病典型病斑的火山口症状依赖于 *pthA4* 的表达, 而分离的湖南柑橘溃疡病致病菌株所致典型症状的差异是否与 *pthA4* 的表达水平以及 *pthA4* 序列差异相关, 有待进一步验证。

参考文献:

- [1] BROWN K. Florida fights to stop citrus canker[J]. Science, 2001, 292: 2275-2276.
- [2] 李大志, 邓子牛, 甘霖, 等. 柑橘溃疡病研究进展[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2005, 31(4): 105-108.

- [3] VAUTERIN L, YANG P, HOSTE B, et al. Differentiation of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, fatty acid analysis, and DNA-DNA hybridization[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1991, 41(4): 535-542.
- [4] LEE H A. Further data on the susceptibility of rutaceous plants to citrus canker[J]. Journal of Agricultural Research, 1918, 15(2): 661-665.
- [5] JANSSEN P, COOPMAN R, HUYS G, et al. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy[J]. Frontiers in Oral Health, 1996, 142(7): 1881-1893.
- [6] CIVEROLO E L. Citrus bacterial canker disease: an overview[J]. Proc of the International Society of Citriculture, 1982(1): 390-394.
- [7] NESME X, VANECHOUTTE M, ORSO S, et al. Diversity and genetic relatedness within genera *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas* using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rRNA gene[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1995, 18(1): 127-135.
- [8] 杨贵兵. 甜橙类柑橘溃疡病高效防控技术研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2020.
- [9] 王朝阳. 柑橘溃疡病与疮痂病的区别及防治[J]. 中国园艺文摘, 2013, 29(5): 208-209.
- [10] HARTUNG J, CIVEROLO E. Genomic fingerprints of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* strains from Asia, South America, and Florida[J]. Phytopathology, 1987, 77: 282-285.
- [11] 王中康, 孙宪昀, 夏玉先, 等. 柑桔溃疡病菌 PCR 快速检验检疫技术研究[J]. 植物病理学报, 2004, 34(1): 14-20.
- [12] 胡春华. *pthA-nls* 及其 *ScFv* 基因转化柑橘获得抗溃疡病新种质的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2008.
- [13] LOUWS F J, FULBRIGHT D W, STEPHENS C T, et al. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(7): 2286-2295.
- [14] CUBERO J, GRAHAM J H. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in *Citrus* species and design of new primers for their identification by PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(3): 1257-1264.
- [15] GRAHAM J H, GOTTWALD T R, CUBERO J, et al. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker[J]. Molecular Plant Pathology, 2004, 5(1): 1-15.
- [16] 姚廷山, 周彦, 周常勇. 柑橘溃疡病菌分化及防治研究进展[J]. 园艺学报, 2015, 42(9): 1699-1706.
- [17] 李文婷, 李翠晓, 林小清, 等. 基于 STR 位点对广东省柑橘溃疡病菌种群遗传结构的分析[J]. 园艺学报, 2022, 49(6): 1233-1246.
- [18] 杨贵兵, 韩健, 李文星, 等. 柑橘溃疡病菌的侵染过程及噻森铜对溃疡病的防治效果[J]. 植物保护学报, 2021, 48(2): 322-331.
- [19] 刘利平. 柑橘溃疡病菌致病性影响因素的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
- [20] 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [21] HARTUNG J S, DANIEL J F, PRUVOST O P. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction method[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(4): 1143-1148.
- [22] WEISBURG W G, BARNS S M, PELLETIER D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [23] 李建挥. 柑橘溃疡病有效防治的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
- [24] CARVALHO S A, WMC N, BELASQUE-JUNIOR J, et al. Comparison of resistance to Asiatic citrus canker among different genotypes of *Citrus* in a long-term canker-resistance field screening experiment in Brazil[J]. Plant Disease, 2015, 99(2): 207-218.
- [25] 潘贞珍, 黄运鹏, 黄桂香, 等. 3 个柑橘品种叶片结构和生化物质与柑橘溃疡病抗性的相关性研究[J]. 中国果树, 2020(4): 31-36.
- [26] 徐磊. 柑橘溃疡病病原菌的分子鉴定与抗病资源的筛选[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2008.
- [27] ABE V Y, BENEDETTI C E. Additive roles of *PthAs* in bacterial growth and pathogenicity associated with nucleotide polymorphisms in effector - binding elements of citrus canker susceptibility genes[J]. Molecular Plant Pathology, 2016, 17(8): 1223-1236.
- [28] TEPER D, XU J, LI J Y, et al. The immunity of *Meiwa kumquat* against *Xanthomonas citri* is associated with a known susceptibility gene induced by a transcription activator-like effector[J]. PLoS Pathogens, 2020, 16(9): e1008886.
- [29] LI N, HUANG L, LIU L P, et al. The relationship between *PthA* expression and the pathogenicity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*[J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(2): 967-975.

责任编辑: 罗慧敏
英文编辑: 罗维