

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.08.006

杨修镔, 何祥驹, 胡浩然, 等. 重庆核桃细菌性黑斑病病原鉴定及多样性分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(8): 60-72.

重庆核桃细菌性黑斑病病原鉴定及多样性分析

杨修镔¹, 何祥驹¹, 胡浩然¹, 李秀珍², 窦彦霞¹,
唐佳佳², 毕朝位¹, 青玲¹, 吴根土¹

1. 西南大学 植物保护学院, 重庆 400715; 2. 重庆市林业科学研究院, 重庆 400036

摘要: 为明确重庆市核桃细菌性黑斑病病原物种类及其遗传多样性情况, 于 2022 年 4 月至 2023 年 7 月在重庆市核桃种植区采集病害样品并进行组织分离、致病性测定、16S rDNA 鉴定和利用 rep-PCR 指纹图谱技术进行遗传多样性分析。研究结果显示: 从重庆市北碚区、城口县等地获得呈现多角状黑斑症状的病害样品 120 份, 分离获得 54 株病原菌, 通过 16S rDNA 扩增等方法鉴定到为害重庆市核桃细菌性黑斑病的病原物为野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 和成团泛菌 (*Pantoea agglomerans*)。基于大肠杆菌基因间共有重复序列 (ERIC) 和 BOX 插入因子 (BOX) 多态性扩增结果进行遗传多样性分析, 结果发现, 野油菜黄单胞菌遗传多样性指数 (h) 为 0.375 4, 香农指数 (I) 为 0.543 7, 居群间基因多样性指数 (G_{st}) 为 0.519 7, 基因流 (N_m) 为 0.462 0; 成团泛菌 3 个居群的 Nei's 基因多样性指数 (h) 为 0.353 9, I 为 0.525 3, G_{st} 为 0.100 7, N_m 为 4.465 7, 表明重庆市野油菜黄单胞菌和成团泛菌遗传多样性较高, 适应外部环境变化能力较强。

关键词: 核桃细菌性黑斑病; 野油菜黄单胞菌; 成团泛菌;
遗传多样性分析

中图分类号: S436.64

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2025)08-0060-13

Identification and Diversity Analysis of Walnut Bacterial Black Spot Pathogens in Chongqing

YANG Xiubin¹, HE Xiangju¹, HU Haoran¹,
LI Xiuzhen², DOU Yanxia¹, TANG Jiajia²,
BI Chaowei¹, QING Ling¹, WU Gentu¹

1. School of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Chongqing Academy of Forestry, Chongqing 400036, China

Abstract: This study aimed to identify the bacterial species responsible for walnut black spot in Chongqing

收稿日期: 2025-02-27

基金项目: 重庆市林业局科技兴林项目重大专项(ZD2023-1)。

作者简介: 杨修镔, 硕士, 主要从事植物病理学研究。

通信作者: 吴根土, 副教授。

and to analyze their genetic diversity. During the time of April 2022 to July 2023, diseased walnut samples were collected from various walnut-growing regions in Chongqing, and tissue isolation, pathogenicity determination, 16S rDNA identification and genetic diversity analysis using rep-PCR fingerprinting techniques were performed. The results indicated that 120 diseased samples with polyangular black spot symptom were collected from Beibei District and Chengkou County, from which, 54 bacterial strains were isolated. These strains were identified through 16S rDNA amplification as *Xanthomonas campestris* and *Pantoea agglomerans*. Genetic diversity analysis was performed using rep-PCR fingerprinting with primers targeting repetitive Entero bacterial Intergenic Consensus (ERIC) sequences and BOX insertion sequences. The results revealed that *X. campestris* strains had a Nei's gene diversity index (h) of 0.375 4, a Shannon index (I) of 0.543 7, an inter-population gene diversity index (G_{st}) of 0.519 7, and a gene flow index (N_m) of 0.462 0. *P. agglomerans* strains exhibited an h index of 0.353 9, an I index of 0.525 3, a G_{st} index of 0.100 7, and an N_m index of 4.465 7. These evidences indicate a high level of genetic diversity among the bacterial populations, suggesting a strong adaptability to environmental changes.

Key words: walnut bacterial black spot; *Xanthomonas campestris*; *Pantoea agglomerans*; genetic diversity analysis

核桃(*Juglans regia* L.)为胡桃科(Juglandaceae)胡桃属(*Juglans*)树木,是我国重要的经济林木,以城口县为代表,重庆市有悠久的核桃种植历史^[1]。细菌性黑斑病是核桃上的三大病害之一,在我国北京、山东等地及韩国、立陶宛、波兰^[2-6]等核桃种植区均有报道,为世界性核桃病害。核桃细菌性黑斑病染病叶片初期大多表现为带有黄色晕圈的不规则黑斑,病部呈现水渍状,严重时造成核桃组织腐烂坏死。王瀚等^[7-8]报道甘肃陇南地区核桃细菌性黑斑病的病原物为野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)和成团泛菌(*Pantoea agglomerans*);肖波等^[9]报道云南地区核桃细菌性黑斑病的病原物为树生黄单胞菌(*X. arboricola*)和成团泛菌(*P. agglomerans*);瞿佳等^[10]报道陕西地区的核桃细菌性黑斑病的病原物为野油菜黄单胞菌(*X. campestris*)和成团泛菌(*P. agglomerans*)。根据前期的研究发现核桃细菌性黑斑病的病原物主要为野油菜黄单胞菌^[11-13]和成团泛菌^[14-15]。这两种病原物寄主广泛,除了侵染核桃树,也能侵染李子树、桃树、苹果树等经济林木^[16-17]。成团泛菌在空气中广泛存在,与植物共生或者在植物体内生,对植物存在机会性侵染^[18],虽然成团泛菌分离率更高,但野油菜黄单胞菌具有比成团泛菌更强的侵染力。

分子标记技术(Molecular Markers)出现于 1974 年。分子标记以个体间遗传物质内的核苷酸序列变异为基础,反映 DNA 水平遗传多态性,自第一代分子标记技术限制性片段长度多态性标记 RFLP^[19]开发以来,又陆续发现了 RAPD(随机扩增多态 DNA 标记技术)^[20]、AFLP(扩增片段长度多态性)^[21]、SSR(简单重复序列)^[22]和 ISSR(简单序列重复区间)^[23]分子标记技术。分子标记分型技术应用广泛,早在 1987 年 Lazo 等^[24]就已经利用 RFLP 技术对野油菜黄单胞菌进行致病变种类型研究,分子标记技术相比于传统的遗传标记方法如形态学标记、代谢表型标记、化学标记等方法具有稳定性强,可处理信息量大,方便快捷的优点,成为研究种群遗传结构的重要研究方法。指纹图谱技术是从选取细菌基因组中的短重复回文序列中的保守区段 BOX 插入因子^[25-26]和大肠杆菌基因间共有重复序列 ERIC^[27-28]进行多态化扩增,电泳后能获得分离株的指纹图谱,通过多态性条带分布情况来对菌株分型。马来西亚研究人员成功运用该方法对为害当地橡胶产业的短小芽孢杆菌进行了遗传多样性分析^[29]。该方法简便快捷,易于在实验室操作,成为目前实验室常用的细菌群体遗传分析分子标记技术。

重庆市长江中上游地区是核桃规模化种植区,以城口县为代表,栽培面积达到 2 万 hm^2 ,核桃年产量达到 3 000 万 t,核桃产业是重庆市重要的支柱产业。近年来,核桃细菌性黑斑病频繁暴发,目前对重庆市核桃细菌性黑斑病的研究较少,且未建立完善的核桃细菌性黑斑病防控体系。核桃细菌性黑斑病的发生导致核桃园减产,严重打击了重庆市核桃种植户的积极性,阻碍了核桃产业的向好发展^[30]。本研究通过采集重庆市核桃病害样品,进行系统性的病原鉴定分析,明确为害重庆市核桃的细菌性黑斑病病原种类,在此基础上进行病原菌群遗传多样性分析,评判重庆市病原菌群适应环境变化能力,旨在为核桃细菌性黑斑病

的绿色防控奠定实践基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病害样品采集

本研究于 2022 年 4 月至 2023 年 7 月踏查重庆市 14 个区(县)核桃种植园,采集显现细菌性黑斑病症状的病害样品并记录细菌性黑斑病的田间症状,共从重庆市 14 个区(县)采集包括叶片、枝杆和果实 120 份样品,样品信息和编号如表 1 所呈现,其中石柱土家族自治县、秀山土家族苗族自治县、彭水苗族土家族自治县分别简称为石柱县、秀山县、彭水县。

表 1 重庆市核桃病样采集信息表

采样时间	地点	部位	样品份数/份		编号
2022-4-23	北碚区柳荫镇	叶片(2)、枝杆(2)、果实(2)	6	LYL、LYS、LYF	
2022-05-03	北碚区缙云山	叶片(2)、枝杆(1)	3	JYL、JYS	
2022-05-06	石柱县鱼池镇	叶片(2)、枝杆(2)	4	SZL、SZS	
2022-05-21	黔江区白石镇	叶片(3)、枝杆(2)、果实(2)	7	BSL、BSS、BSF	
2022-05-22	巫溪县菱角镇、上磺镇	叶片(3)、枝杆(3)、果实(4)	10	WLF、WYY/WYQ/WYS、	
2022-06-03	涪陵区龙潭镇	叶片(1)、枝杆(1)、果实(1)	3	WDL、WDS、WDF	
2022-06-03	巫溪县中梁乡	果实(1)	1	WSF	
2022-06-23	城口县修齐镇、厚坪乡、高观镇	叶片(3)、枝杆(3)、果实(3)	9	CXJ、CHP、CGW	
2022-07-09	合川区渭沱镇	枝杆(2)、果实(1)	3	HWS、HWF	
2022-09-06	丰都县虎威镇、三元镇	枝杆(3)、叶片(1)	4	FDHWS、FDSYS/L	
2022-09-06	南川区太平场镇	枝杆(2)	2	NCTPCS	
2022-09-16	城口县高观镇	叶片(3)、果实(1)、枝杆(1)	5	97WXCL/F/S、WSCL、97BYCL	
2022-09-30	北碚区天府镇	叶片(2)、枝杆(1)	3	BTZL/S	
2022-10-20	云阳县高阳镇	叶片(1)	1	YYGYL	
2023-03-11	云阳县洞鹿乡	枝杆(1)	1	YYQKS	
2023-03-30	北碚区天府镇	叶片(1)	1	BTZL-5	
2023-05-12	城口县高观镇	叶片(5)、枝杆(4)	9	CKGGL/S	
2023-05-12	巫溪县上磺镇、古路镇	叶片(2)、枝杆(1)	3	WXYJL/S/F、WXDSL/S/F、WXLPL	
2023-05-12	巫山县龙溪镇	叶片(2)	2	WSLXL	
2023-05-29	南川区水江镇	叶片(2)	2	NCSJL	
2023-05-29	丰都县武平镇、三元镇、	叶片(2)	2	FDSYL、FDWPL	
2023-05-29	北碚区柳荫镇	叶片(1)	1	BTLYL	
2023-06-04	云阳县高阳镇	叶片(2)、果实(1)	3	YYGYL/F	
2023-06-10	彭水县鹿鸣乡、龙射镇	叶片(1)、枝杆(2)、果实(2)	5	PSLML/S、PSLSF、	
2023-06-10	秀山县妙泉镇	叶片(3)、枝杆(2)、果实(2)	7	XSMQL/S/F	
2023-06-15	奉节县吐祥镇	叶片(2)、果实(1)	3	FJTXL/F	
2023-06-15	巫山县龙溪镇	果实(1)	1	WSLXF	
2023-06-26	綦江区石壕镇、赶水镇、篆塘镇	叶片(3)、枝杆(3)	6	QJSHL/S、QJGSL/S、QJGSL/S	
2023-07-03	合川区渭沱镇	叶片(2)	2	HCL	
2023-07-10	黔江区黄溪镇	叶片(2)、枝杆(1)、果实(1)	4	BSQJHXL/S/F	
2023-07-18	城口县高观镇	叶片(3)、果实(2)、枝杆(2)	7	CKWXL/S/F、CKSZL/F	

1.1.2 供试培养基

使用营养琼脂固体培养基(NA)来培养和纯化病原菌、使用 Luria-Bertani 液体培养基(胰蛋白胨 10.0 g/L、酵母提取物 5.0 g/L、氯化钠 10.0 g/L)来培养菌,制备菌液。

1.1.3 所用引物

27F/1492R 引物^[31]扩增病原菌 16S rDNA 序列,用于鉴定病原菌种类;ERIC1R/ERIC2^[32]用于扩增大肠杆菌基因间共有重复序列,BoxA1R 为单引物^[33],扩增 BOX 插入因子,通过多态化扩增结果对病原菌进行分型。本研究所用的引物如表 2 所示,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 2 引物序列信息表

引物名称	引物序列(5'-3')	PCR 程序
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ^[31]	5 min 95℃; 1 min 94℃, 30 s 56℃, 100 s 72℃(30 cycles); 10 min 72℃
1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' ^[31]	
ERIC1R	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' ^[32]	10 min 95℃; 1 min 94℃, 1 min 54℃, 8 min 65℃ (30 cycles); 15 min 65℃
ERIC2	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' ^[32]	
BoxA1R	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' ^[33]	

1.2 试验方法

1.2.1 16S rDNA 分子鉴定

采用组织分离法从病害样品中分离出病原细菌,按照细菌总 DNA 提取试剂盒(北京全式金公司,EE161-01)说明书方法提取菌株 DNA,PCR 扩增体系:2×Taq Master Mix 酶 10 μL,27F/1492R 各 1 μL,DNA 样品 1 μL,ddH₂O 7 μL。按照表 2 所示 PCR 程序进行扩增,将 PCR 扩增产物进行凝胶电泳检测,切胶回收长度为 1 500 bp 左右的扩增产物,按照 DNA 胶回收试剂盒使用说明纯化回收 PCR 产物,将 DNA 扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序结果上下游序列拼接后于 NCBI 网站进行 Blast 比对,鉴定病原菌的属种。

1.2.2 病原菌单菌落形态观察

使用接种环蘸取病原细菌菌液在 NA 固体培养基上划线,置于 28℃ 培养基培养,分别于培养 1 d、2 d、3 d 观察单菌落形态特征并拍照记录。

1.2.3 柯赫氏法则证病

制备浓度为 10⁸ CFU/mL 的病原菌液,采摘生长状况一致的健康核桃叶片,将托盘用 75%乙醇擦拭干净后铺上一层无菌纱布,倒上适量的无菌水,放上“L”形玻璃支架。将叶片清洗干净后晾干,用灼烧灭菌的挑针刺伤叶片,将处理后的叶片放在玻璃支架上。用灼烧灭菌的接种环蘸取菌液涂抹于伤口周围,对照组使用无菌水涂抹。用纱布蘸取无菌水包裹叶柄,托盘用塑料膜封住保湿,于 25℃ 温室中保湿培养 5 d 左右观察结果。将发病叶片病组织再次进行组织分离,将纯化培养物在平板上划线观察并进行 16S rDNA 分子检测,比对回接材料分离物与分离菌株是否为同一种微生物。

1.2.4 遗传多样性分析

挑选获得的核桃细菌性黑斑病分离株共 47 株,PCR 体系:2×Taq Master Mix 酶,上下游引物各 1 μL,DNA 样品 3.5 μL,加 ddH₂O 补足 25 μL。使用 ERIC1R、ERIC2 扩增大肠杆菌基因间共有重复序列,BoxA1R 扩增 BOX 插入因子序列(PCR 扩增程序详见表 2)。

将扩增产物进行凝胶电泳(电压 146 v,电流 277 mA,时间 20 min)后拍照,对不同样品的多态性条带分布进行统计,样品在等位基因位点有条带记为 1,无则记为 0,将电泳图谱整理成 0/1 矩阵形式的 Excel 表格,使用 NTSYS 2.10 软件进行基于 UPGMA 算法的聚类分析,根据重庆市地貌特征将不同区(县)的菌

株样品划分为 3 个居群(表 3), 使用 Popgene 1. 32 软件计算样品的遗传多样性参数。

表 3 重庆市各区(县)地理划分

区(县)	地理区域
北碚区、南川区、綦江区	都市区(DSQ)
城口县、丰都县、云阳县、奉节县、巫山县、巫溪县	渝东北地区(YDB)
黔江区、石柱县、秀山县、彭水县	渝东南地区(YDN)

2 结果与分析

2.1 重庆市核桃细菌性黑斑病症状

在田间采样发现, 细菌性黑斑病为害重庆核桃的叶片、枝杆和果实。定期对重庆市北碚区天府镇中心村(106°28'E, 29°50'N)的核桃进行观察发现, 核桃在 3 月长出新叶, 4 月开花, 该时期部分叶片出现小黑点; 5 月核桃长出幼果, 此时叶片上出现明显的多角状黑斑; 7、8 月雨量增大, 核桃的叶片、枝杆、果实出现大面积黑斑, 植株组织腐烂流出脓水, 核桃园受害严重。其具体表现为叶片上出现黑色, 多角形病斑, 部分病斑周围显现黄色晕圈; 枝杆上为条状黑褐色斑块, 病斑部位呈水腐状, 树皮及韧皮部变黑腐烂, 潮湿时韧皮部下方有菌脓; 果实受害时表皮出现黑色斑块, 后迅速扩大渐凹陷变黑, 外围有水渍状晕纹, 严重时果仁变黑腐烂(图 1)。



图 1 重庆市核桃细菌性黑斑病在田间为害症状

2.2 病原菌单菌落形态观察

接种在 NA 固体培养基上的野油菜黄单胞菌和成团泛菌单菌落均为光滑乳脂状, 初期 1~2 d 为乳白色菌落, 随着野油菜黄单胞菌和成团泛菌黄原胶等色素类物质^[34]的产生, 培养 3 d 后野油菜黄单胞菌呈淡黄色, 成团泛菌呈蜡黄色(图 2)。

2.3 病原菌 16S rDNA 分子鉴定

通过 DNA 测序获得病原菌 16S rDNA 区段碱基序列, 在 NCBI 网站上与野油菜黄单胞菌(NR119219)、成团泛菌(AB907779)进行 DNA 碱基序列比对, 明确了重庆市核桃细菌性黑斑病的病原菌为野油菜黄单胞菌、成团泛菌。从 120 份样品中分离到病原细菌 54 株, 其中成团泛菌 41 株, 占比 75. 9%, 分离自綦江区、南川区、丰都县、彭水县、黔江区、秀山县、奉节县、云阳县、巫山县、巫溪县、城口县、石柱县。野油菜黄单胞菌 13 株, 占比 24. 1%, 分离自城口县、云阳县、北碚区、石柱县(图 3、表 4)。

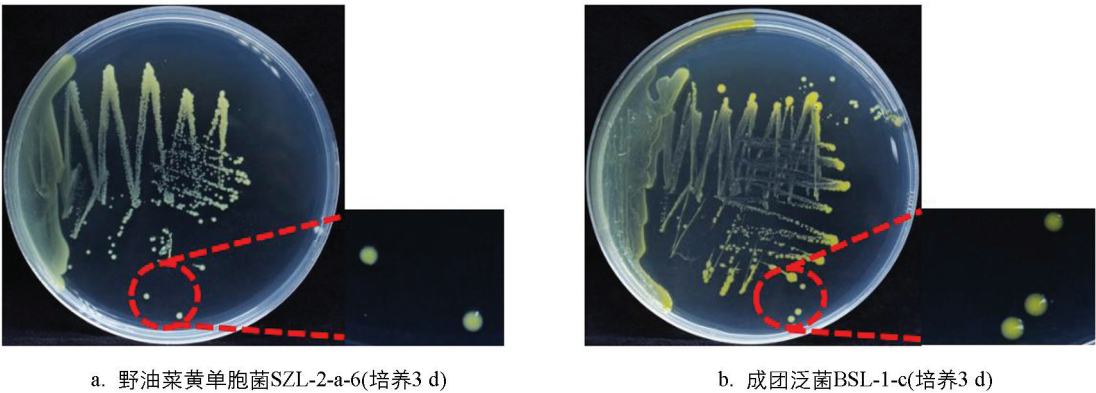
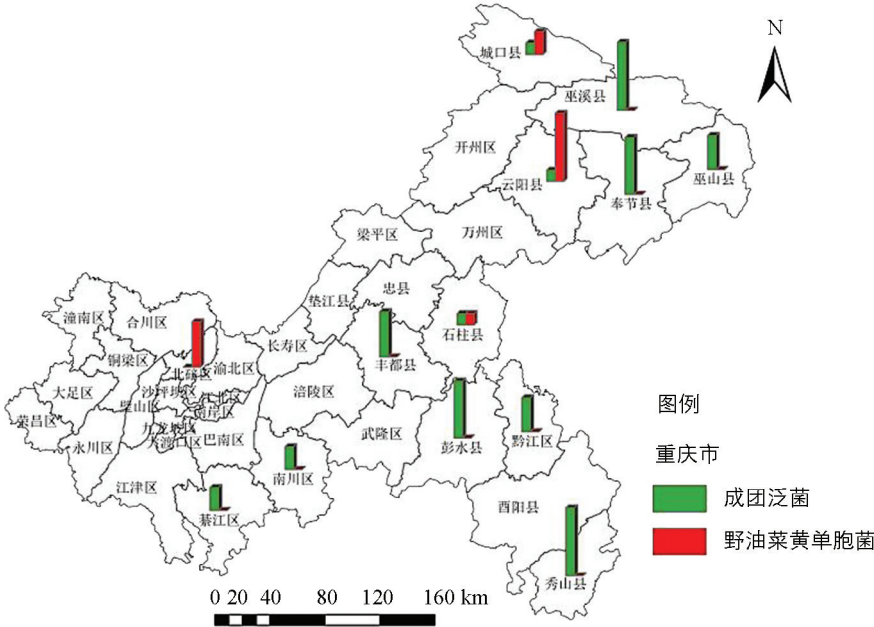


图 2 病原菌培养皿单菌落形态



重庆市地图来源于阿里云地图，数据源为高德地图开放平台，审图号：GS(2024)1158 号。

图 3 重庆市各区(县)核桃细菌性黑斑病病原菌分离情况

表 4 病原菌分离株 16S rDNA 鉴定结果

采集地点	部位	中文名	菌液编号	同源性/%
黔江区白石镇凤山村	叶片	成团泛菌	BSL-1-c	97.36
黔江区白石镇凤山村	叶片	成团泛菌	BSL-1-d	97.66
黔江区白石镇凤山村	枝杆	成团泛菌	BSS-b	97.62
巫溪县严家村	果实	成团泛菌	WYYF-b	98.04
巫溪县严家村	果实	成团泛菌	WXYJQXF-1	99.90
巫溪县严家村	果实	成团泛菌	WXYJF-5-2	99.80
巫溪县严家村	叶片	成团泛菌	WXYJL-5-1	99.90
巫溪县严家村	叶片	成团泛菌	WXYJL-4	99.46
巫溪县德胜村	叶片	成团泛菌	WXDSL-1-2	99.80
云阳县高阳镇	果实	成团泛菌	YYGYF-1-3	99.39
巫山县龙溪镇	叶片	成团泛菌	WSLXL-2-1	99.46
巫山县龙溪镇	叶片	成团泛菌	WSLXL-2-2	99.37

续表 4

采集地点	部位	中文名	菌液编号	同源性/%
巫山县龙溪镇	叶片	成团泛菌	WSLXL-2-4	99.60
綦江区赶水镇	枝杆	成团泛菌	QJGSS-1	99.29
綦江区石壕镇	枝杆	成团泛菌	QJSHS-2	99.45
丰都县三元镇	枝杆	成团泛菌	FDSYS-3	99.90
丰都县虎威镇	枝杆	成团泛菌	FDHWS-1	99.90
丰都县武平镇	叶片	成团泛菌	FDWPL-1-1	99.12
丰都县武平镇	叶片	成团泛菌	FDWPL-1-2	99.20
丰都县武平镇	叶片	成团泛菌	FDWPL-1-3	99.91
南川区太平场镇	枝杆	成团泛菌	NCTPCS-2	97.83
南川区太平场镇	枝杆	成团泛菌	NCTPCS-3	99.80
城口县高观镇	果实	成团泛菌	CKGF5M-1	99.90
秀山县妙泉镇	果实	成团泛菌	XSMQF-1-1	98.61
秀山县妙泉镇	果实	成团泛菌	XSMQF-1-3	99.72
秀山县妙泉镇	果实	成团泛菌	XSMQF-1-5	99.65
秀山县妙泉镇	果实	成团泛菌	XSMQF-1-4	98.94
秀山县妙泉镇	果实	成团泛菌	XSMQF-1-2	98.95
秀山县妙泉镇	叶片	成团泛菌	XSMQL-1-3	98.62
奉节县吐祥镇	叶片	成团泛菌	FJTXL-1-1	98.95
奉节县吐祥镇	叶片	成团泛菌	FJTXL-1-3	98.54
奉节县吐祥镇	叶片	成团泛菌	FJTXL-1-4	98.52
奉节县吐祥镇	叶片	成团泛菌	FJTXL-1-5	98.59
奉节县吐祥镇	叶片	成团泛菌	FJTXL-1-6	98.67
奉节县吐祥镇	果实	成团泛菌	FJTXF-1-2	98.78
彭水县龙射镇	果实	成团泛菌	PSLSF-1-1	99.64
彭水县龙射镇	果实	成团泛菌	PSLSF-1-5	100.00
彭水县鹿鸣乡	叶片	成团泛菌	PSLML-1-3	99.02
彭水县鹿鸣乡	枝杆	成团泛菌	PSLMS-1-3	100.00
彭水县鹿鸣乡	枝杆	成团泛菌	PSLMS-1-6	99.90
石柱县鱼池镇	叶片	成团泛菌	SZL-2-a-2	98.20
石柱县鱼池镇	叶片	野油菜黄单胞菌	SZL-2-a-6	97.76
北碚区天府镇中心村	叶片	野油菜黄单胞菌	BTZL-2-1	99.90
北碚区天府镇中心村	叶片	野油菜黄单胞菌	BTZL-5	99.80
北碚区天府镇中心村	叶片	野油菜黄单胞菌	BTZL-5-1	99.90
北碚区天府镇中心村	叶片	野油菜黄单胞菌	BTZL-5-2	100.00
城口县高观镇渭溪村	枝杆	野油菜黄单胞菌	CKWXS-4	99.90
城口县高观镇白岩村	叶片	野油菜黄单胞菌	97BYCL-2	97.21
云阳县洞鹿乡	枝杆	野油菜黄单胞菌	YYQKS-2	99.60
云阳县洞鹿乡	枝杆	野油菜黄单胞菌	YYQKS-5	99.80
云阳县洞鹿乡	枝杆	野油菜黄单胞菌	YYQKS-13	99.90
云阳县洞鹿乡	枝杆	野油菜黄单胞菌	YYQKS-14	99.80
云阳县洞鹿乡	枝杆	野油菜黄单胞菌	YYQKS-16	99.90
云阳县洞鹿乡	枝杆	野油菜黄单胞菌	YYQKS-24	99.90

2.4 柯赫氏法则证病

用针刺法将病原菌接种至离体核桃样品,5 d 后观察到处理组接种部位与对照组相比有明显的黑斑出现,黑斑边缘不规则且呈水渍状,离体接种叶片发病症状与田间病害样品症状相似。将发病的回接材料组织分离纯化,通过形态学观察和 16S rDNA 鉴定到接种菌和回接材料分离物为同一种细菌微生物,证明病原分离株能侵染核桃植株引起核桃细菌性黑斑病。

2.5 重庆核桃细菌性黑斑病菌种群多态化片段扩增

采用 rep-PCR 技术对本研究所获得的菌株进行 ERIC 多态化片段扩增(图 4)和 BOX 多态化片段扩增(图 5),并对获得的多态性条带进行统计。结果显示:野油菜黄单胞菌 ERIC 多态化片段扩增,片段长度为 100~5 000 bp,共计 7 个总位点,7 个多态性位点,多态性比率为 100%;BOX 多态化片段扩增,片段长度为 500~5 000 bp,共计 6 个总位点,5 个多态性位点,多态性比率为 74.5%。成团泛菌 ERIC 多态化片段扩增,片段长度为 100~5 000 bp,共计 11 个总位点,11 个多态性位点,多态性比率为 100%;BOX 多态化片段扩增,片段长度为 500~5 000 bp,共统计到 9 个总位点,8 个多态位点,多态性比率为 81.6%。

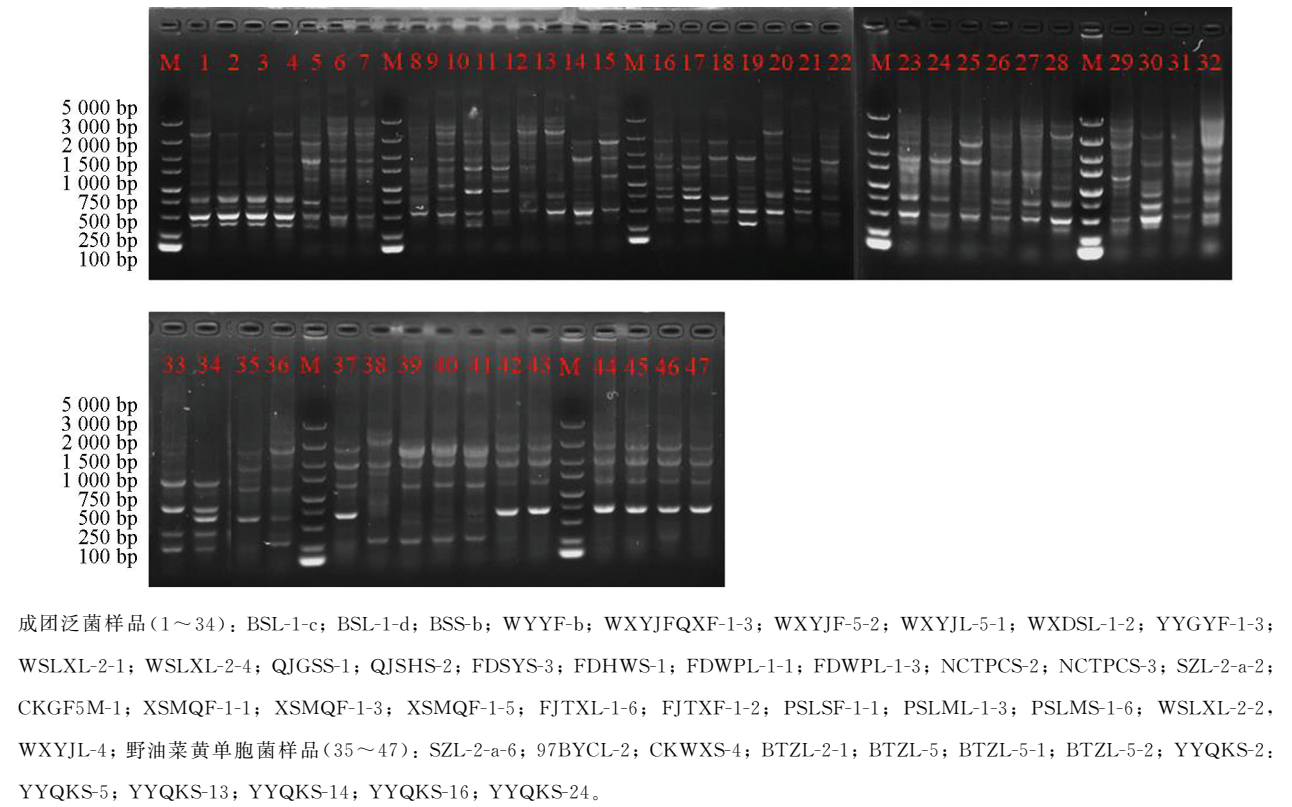
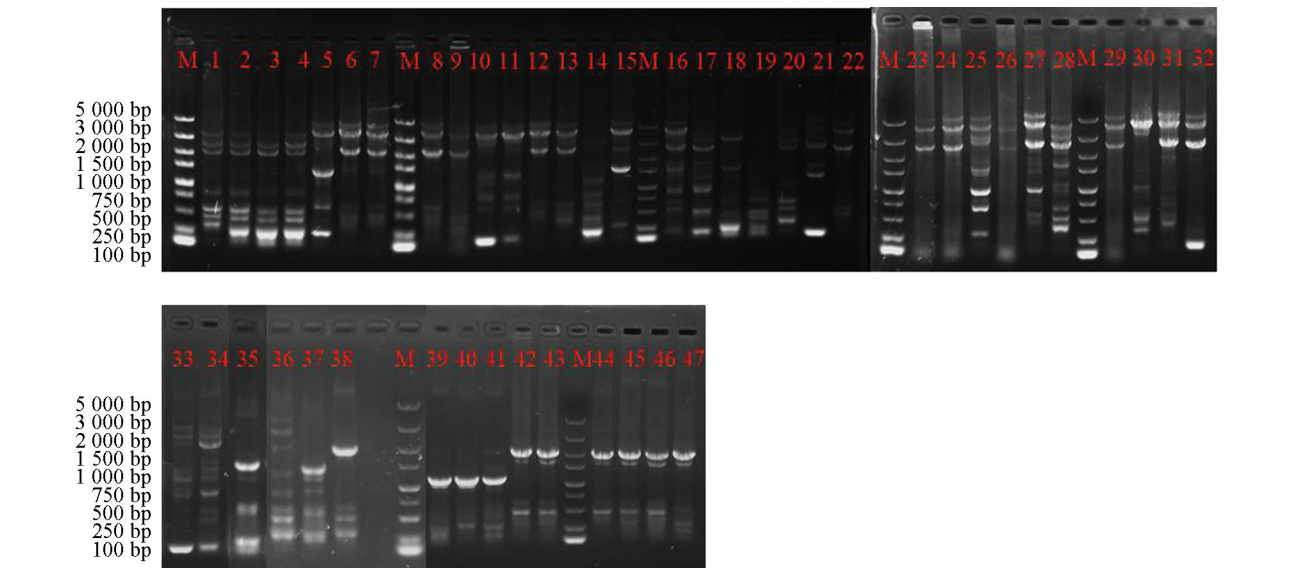


图 4 病原菌样品的 ERIC 电泳

2.6 重庆核桃细菌性黑斑病菌遗传多样性分析

根据多态片段扩增结果,统计电泳图谱上的等位条带,将电泳图谱转化为 0/1 矩阵,将矩阵数据代入 NTSYS 2.10 软件绘制聚类分析图谱,用 Popgene 1.32 软件计算菌群遗传多样性相关指标参数。

对成团泛菌遗传多样性分析发现菌群遗传相似系数为 0.53~1.0,在遗传相似系数 0.55 时分化为 3 个亚群(图 6);其中 BSL-1-d 等 14 株菌株(黔江区、巫溪县、南川区、綦江区、云阳县、奉节县、丰都县、石柱县)汇聚为亚群 Group I;FDHWS-1 等 18 株菌株(丰都县、秀山县、彭水县、巫溪县、巫山县、南川区、奉节县、城口县)汇聚为亚群 Group II;来自巫溪县菌株 WXDSL-1-2 与彭水县菌株 PSLML-1-3 单独汇聚为一个分支 Group III。根据重庆市地形特征将 34 株成团泛菌划分为 3 个居群后分析得 DSQ 居



成团泛菌样品(1~34): BSL-1-c; BSL-1-d; BSS-b; WYYF-b; WXYJFQXF-1-3; WXYJF-5-2; WXYJL-5-1; WXDSL-1-2; YYGYF-1-3; WSLXL-2-1; WSLXL-2-4; QJGSS-1; QJSHS-2; FDSYS-3; FDHWS-1; FDWPL-1-1; FDWPL-1-3; NCTPCS-2; NCTPCS-3; SZL-2-a-2; CKGF5M-1; XSMQF-1-1; XSMQF-1-3; XSMQF-1-5; FJTXL-1-6; FJTXF-1-2; PSLSF-1-1; PSLML-1-3; PSLMS-1-6; WSLXL-2-2; WXYJL-4; 野油菜黄单胞菌样品(35~47): SZL-2-a-6; 97BYCL-2; CKWXS-4; BTZL-2-1; BTZL-5; BTZL-5-1; BTZL-5-2; YYQKS-2; YYQKS-5; YYQKS-13; YYQKS-14; YYQKS-16; YYQKS-24。

图 5 病原菌样品的 BOX 电泳图

群的 Nei's 遗传多样性指数(h)为 0.278 0, 香农指数(I)为 0.414 1; YDN 居群的 Nei's 基因多样性指数(h)为 0.300 2, 香农指数(I)为 0.455 0; YDB 居群的 Nei's 基因多样性指数(h)为 0.356 5, 香农指数(I)为 0.526 5(表 5)。成团泛菌 3 个居群的 Nei's 基因多样性指数(h)为 0.353 9, 香农指数(I)为 0.525 3(表 6); 居群间基因多样性指数(G_{st})为 0.100 7, 基因流(N_m)为 4.465 7, 3 个居群成团泛菌群之间的基因交流水平较高。

表 5 重庆市病原菌样品各居群内的遗传多样性参数

细菌种类	居群	Nei's 基因多样性指数(h)	香农指数(I)
野油菜黄单胞菌	都市区	0.168 9±0.212 2	0.250 9±0.301 2
	渝东北地区	0.207 2±0.209 7	0.311 2±0.295 0
成团泛菌	都市区	0.278 0±0.188 4	0.414 1±0.266 3
	渝东北地区	0.356 5±0.150 4	0.526 5±0.190 7
	渝东南地区	0.300 2±0.160 4	0.455 0±0.216 7

对野油菜黄单胞菌遗传多样性分析得菌群遗传相似系数为 0.48~1.0, 在遗传相似系数 0.48 处分化为两个亚群(图 7)。其中 Group I 包括 SZL-2-a-6 等 9 株菌株(石柱县、云阳县、城口县); Group II 包括 BTZL-2-1 等 4 株菌株(北碚区)。根据地理区域将 13 株划分为两个居群后分析得 DSQ 居群 Nei's 基因多样性指数为 0.168 9, 香农指数为 0.250 9; YDB 居群 Nei's 基因多样性指数(h)为 0.207 2, 香农指数(I)为 0.311 2; 野油菜黄单胞菌遗传多样性指数(h)为 0.375 4, 香农指数(I)为 0.543 7(表 6); 居群间基因多样性指数(G_{st})为 0.519 7, 基因流(N_m)为 0.462 0, 两个居群野油菜黄单胞菌群之间的基因交流水平较低。

表 6 重庆市分离株的遗传多样性参数

细菌种类	Nei's 基因多样性指数(h)	香农指数(I)
野油菜黄单胞菌	0.375 4±0.159 6	0.543 7±0.213 8
成团泛菌	0.353 9±0.139 4	0.525 3±0.178 6

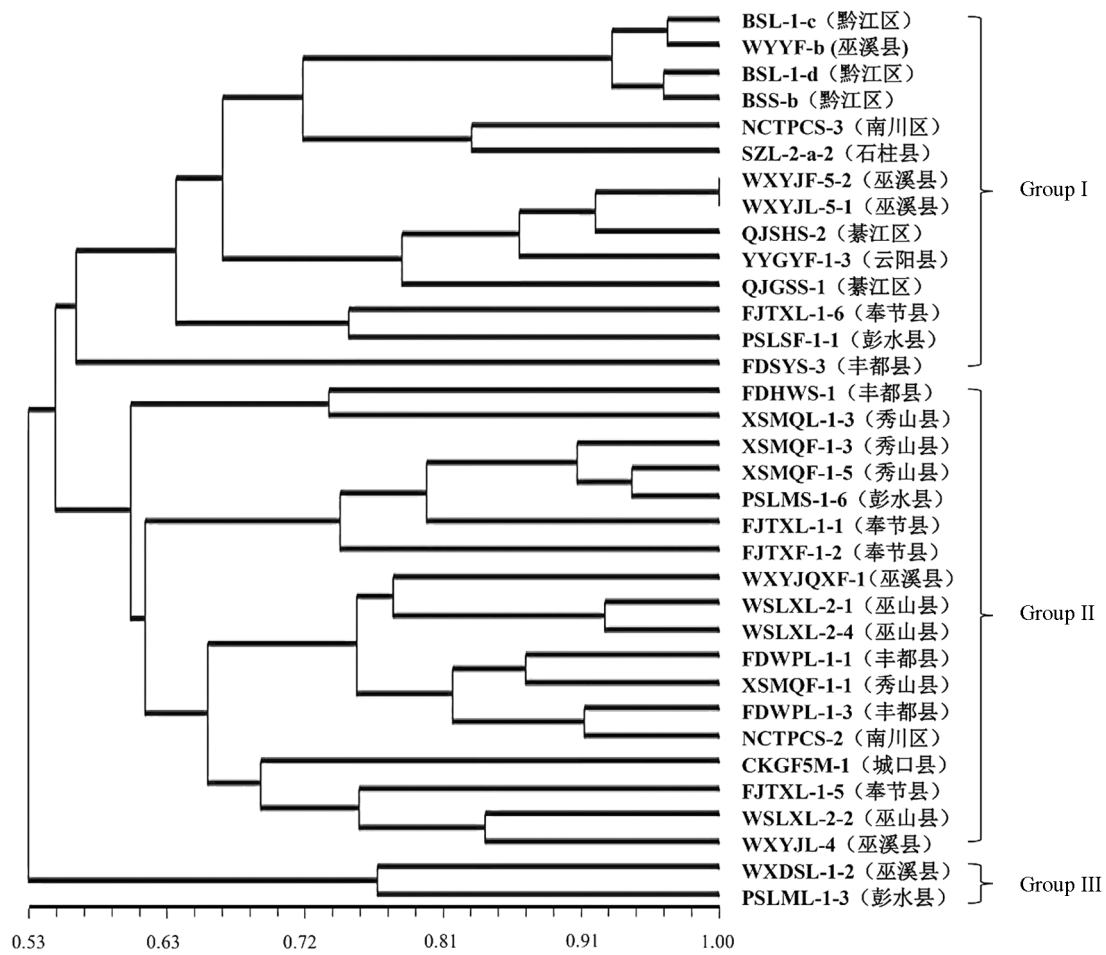


图 6 重庆市成团泛菌分离株基于 ERIC 和 BOX 的聚类分析图谱

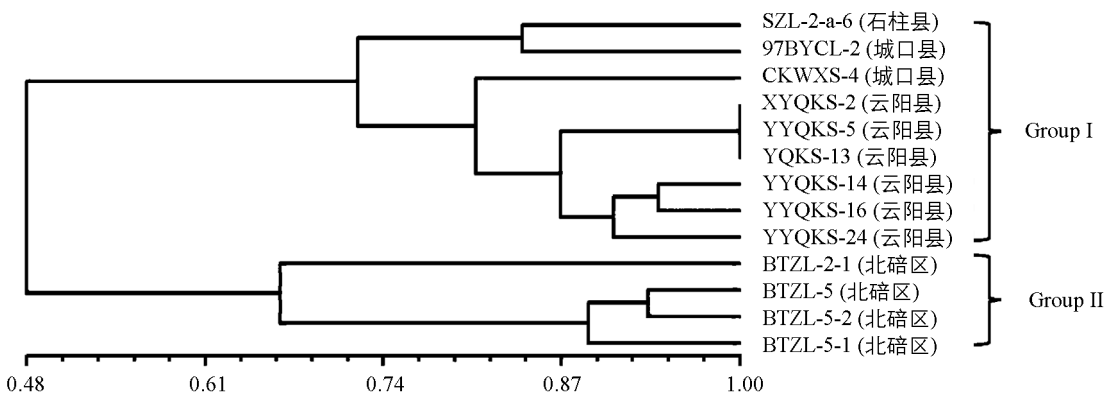


图 7 重庆市野油菜黄单胞菌分离株基于 ERIC 和 BOX 的聚类分析图谱

3 讨论

本研究在对采集自重庆市核桃产区的核桃细菌性黑斑病病害样品进行组织分离后,通过病原菌单菌落形态观察和 16S rDNA 测序鉴定成团泛菌 41 株,野油菜黄单胞菌 13 株。相较于野油菜黄单胞菌,成团泛菌分离率更高,推测原因可能是成团泛菌在自然界分布更广泛。据相关研究,成团泛菌在谷物粉尘和农作物加工设施粉尘中广泛分布,其传播性比野油菜黄单胞菌更强^[35]。参考王绍雪等^[36]的水稻细菌性条斑病接种方法,将菌悬液离体接种到健康核桃叶片,完成了柯赫氏法则证病流程,验证了分离株的致病性,在病原鉴定过程中也发现,除石柱县的病害叶片外,未从同一份病样中同时分离到两种病原物,表明重庆地区这两种病原物在自然状态下不存在明显的复合侵染。

在核桃细菌性黑斑病相关报道中,部分地区鉴定的核桃细菌性黑斑病黄单胞菌属病原物为树生黄单胞菌(*X. arboricola*)。在分类学上,野油菜黄单胞菌属于黄单胞菌属,目前研究鉴定到侵染核桃的黄单胞菌有树生黄单胞菌胡桃变种(*X. arboricola* pv. *Juglandis*)、核桃黄极毛杆菌(*X. campestris* pv. *Juglandis*)等,且黄单胞菌 *X. campestris* 和 *X. arboricola* 两者分类学关系尚不明确,*X. arboricola* 与 *X. campestris* 是否为同一病原物暂无明确定论^[37]。核桃细菌性黑斑病的黄单胞菌属病原物的界定有待后续进一步研究,本研究分离获得的黄单胞菌鉴定为野油菜黄单胞菌(*X. campestris*)。

细菌的传播与风雨因素关联较大^[38],采样期间观察到在潮湿阴面的核桃植株核桃细菌性黑斑病发病更重,核桃叶片从 3 月开始染病,零星出现带黄色晕圈的小黑点,在坐果期发展成为不规则黑斑。核桃细菌性黑斑病在枝干上表现为表皮发黑,严重时扒开树皮有菌脓溢出,皮下组织腐烂,侵染果实时果皮先出现黑斑,由外向内侵染,最终造成果仁腐烂。在重庆 7、8 月雨量增大,有利于病原菌的传播,核桃种植区细菌性黑斑病为害最严重,这与我国其他地区报道一致^[39-41]。本研究暂未对重庆市核桃细菌性黑斑病的流行病学进行探究,后续可对地区降雨量与病害发病情况进行调查,将有助于明确地区降雨对核桃细菌性黑斑病发病的影响。

完成重庆市核桃细菌性黑斑病的鉴定工作后,本研究为探究重庆市病原菌群遗传多样性情况,选取 47 株分离株作为样本进行遗传多样性分析。基于细菌重复回文序列家族基因多态化片段扩增(rep-PCR)指纹图谱技术,对 47 个样品多态化片段电泳图谱扩增结果进行统计,大肠杆菌基因间共有重复序列(ERIC)多态性条带比率高于 BOX 插入因子,表明 ERIC 序列扩增对核桃细菌性黑斑病病原菌的分型效果优于 BOX 序列扩增。地理隔离是生物种群遗传分化的主要影响因素^[42-43],重庆市野油菜黄单胞菌和成团泛菌聚类分析图谱分析发现,菌株群聚和采样地地理间隔距离呈相关性,但由于农事操作和苗木运输等人为因素的影响,导致出现地理间隔较远地区分离株汇聚在同一个亚群的例外情况。如北碚区的野油菜黄单胞菌分离株与其他区(县)的野油菜黄单胞菌分离株分化为不同的两个亚群;綦江区的成团泛菌分离株和城口县的成团泛菌分离株因地理隔离较远,处在不同分支中,符合地理隔离远、遗传距离越远的规律。但巫溪县成团泛菌分离株和綦江区成团泛菌分离株地理距离较远却处于同一亚群中,属于例外情况。对于地理隔离因素主导种群遗传多样性但存在例外情况的现象,推测可能是人为因素的干扰,核桃苗木运输等农事生产活动会突破地理因素限制,促进菌群之间的基因交流,导致地理相隔较远的地区分离株菌群具有较高的遗传相似度。

根据多态性条带统计结果计算出野油菜黄单胞菌遗传多样性指数(h)和香农指数(I)分别为 0.375 4、0.543 7,成团泛菌遗传多样性指数(h)和香农指数(I)分别为 0.353 9、0.525 3。遗传多样性参数越高说明菌群的遗传多样性越高,其遗传变异频率较高,这类菌群应对外部逆境的生存能力就越强。对于田间防控来说,遗传多样性丰富的菌群容易在频繁施药的持续选择压力下进化出耐药菌群^[44],一旦耐药菌群产生,要么加大药剂使用量,要么更换药剂。若加大药剂使用量,田间耐药菌群会占据生态上位,那么药效会越来越弱,迫使种植户在防治过程中不断加大化学药剂使用量,陷入恶性循环,导致药剂失

效。虽然更换药剂可以避免耐药性产生,但目前市面上在售的杀细菌剂种类少且药剂靶标位点单一,可供防治的药剂种类并不多^[45],因此在田间防控过程中应建立以化学防治为主,农业防治、生物防治等手段为辅的综合防控体系。

参考文献:

- [1] 杨康,谢世友. 基于 SWOT 分析的城口县核桃产业现状及对策研究 [J]. 农学学报, 2016, 6(4): 84-90.
- [2] 陈善义,陶万强,王合,等. 北京地区核桃黑斑病病原菌的分离、致病性测定和 16S rDNA 序列分析 [J]. 果树学报, 2011, 28(3): 469-473, 549.
- [3] 曲文文,杨克强,刘会香,等. 山东省核桃主要病害及其综合防治 [J]. 植物保护, 2011, 37(2): 136-140.
- [4] KIM H S, CHEON W, LEE Y, et al. Identification and Characterization of *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis* Causing Bacterial Blight of Walnuts in Korea [J]. Plant Pathology Journal, 2021, 37(2): 137-151.
- [5] BUROKIENE D, PULAWSKA J. Characterization of *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis* Isolated from Walnuts in Lithuania [J]. Journal of Plant Pathology, 2012, 94: 23-27.
- [6] KALUŹNA M, PULAWSKA J, WALERON M, et al. The Genetic Characterization of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, the Causal Agent of Walnut Blight in Poland [J]. Plant Pathology, 2014, 63(6): 1404-1416.
- [7] 王瀚,卓平清,王让军,等. 甘肃陇南核桃黑斑病病原菌的分离鉴定及其致病性研究 [J]. 中国果树, 2018(4): 69-71.
- [8] 王瀚,王让军,田凤鸣,等. 陇南核桃致病性成团泛菌的分离鉴定及其致病性研究 [J]. 福建农业学报, 2016, 31(10): 1086-1090.
- [9] 肖波,卢世栋,杨斌,等. 云南核桃细菌性黑斑病病原菌的分离与鉴定 [J]. 贵州农业科学, 2017, 45(12): 55-58, 63.
- [10] 瞿佳,门欣,孙晓宇,等. 陕西核桃黑斑病病原菌鉴定及药剂防治研究 [J]. 西北农业学报, 2021, 30(3): 452-461.
- [11] FERNANDES C, MARTINS L, TEIXEIRA M, et al. Comparative Genomics of *Xanthomonas euroxanthea* and *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis* Strains Isolated from a Single Walnut Host Tree [J]. Microorganisms, 2021, 9(3): 624.
- [12] 李亚,张珍荫,肖波,等. 核桃细菌性黑斑病病原分子鉴定及室内药剂筛选 [J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2022, 42(5): 104-110.
- [13] LAMICHHANE J R. *Xanthomonas arboricola* Diseases of Stone Fruit, Almond, and Walnut Trees: Progress Toward Understanding and Management [J]. Plant Disease, 2014, 98(12): 1600-1610.
- [14] AN X H, WANG N, WANG H X, et al. Physiological and Transcriptomic Analyses of Response of Walnuts (*Juglans regia*) to *Pantoea Agglomerans* Infection [J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1294643.
- [15] XIAO J W, LIU Z S, SUN S Y, et al. Complete Genome Sequence of *Pantoea agglomerans* CHTF15, A Walnut Pathogen [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2023, 36(2): 134-137.
- [16] 孙前军,杨丽丹,王睿琦,等. 北京平谷区桃细菌性穿孔病病原菌鉴定及其拮抗菌筛选 [J]. 中国生物防治学报, 2024, 40(03): 661-669.
- [17] KIM I Y, PUSEY P L, ZHAO Y F, et al. Controlled Release of *Pantoea agglomerans* E325 for Biocontrol of Fire Blight Disease of Apple [J]. Journal of Controlled Release, 2012, 161(1): 109-115.
- [18] DUTKIEWICZ J, MACKIEWICZ B, KINGA LEMIESZEK M, et al. *Pantoea agglomerans*: A Mysterious Bacterium of Evil and Good. Part III. Deleterious Effects: Infections of Humans, Animals and Plants [J]. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 2016, 23(2): 197-205.
- [19] 高翔,关亚丽. 分子标记技术在入侵植物中的应用研究进展 [J]. 贵州农业科学, 2012, 40(4): 20-23.
- [20] SI Q W, WU G L, YANG H L, et al. Genetic Variation Within and Among Populations of *Ligularia virgaurea* (Asteraceae), an Invasive Weed in the Grassland Ecosystem of the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. Pratacultural Science, 2010, 27(6): 77-87.
- [21] 段惠,强胜,苏秀红,等. 用 AFLP 技术分析紫茎泽兰的遗传多样性 [J]. 生态学报, 2015, 35(8): 2109-2114. DOI: CNKI: SUN: STXB. 0. 2005-08-039.
- [22] LI X X, QIAO L J, CHEN B R, et al. SSR Markers Development and Their Application in Genetic Diversity Evaluation

- of Garlic (*Allium Sativum*) Germplasm [J]. *Plant Diversity*, 2022, 44(5): 481-491.
- [23] AKHTAR N, HAFIZ I A, HAYAT M Q, et al. ISSR-Based Genetic Diversity Assessment of Genus *Jasminum* L. (Oleaceae) from Pakistan [J]. *Plants*, 2021, 10(7): 1270.
- [24] LAZO G R, ROFFEY R, GABRIEL D W. Pathovars of *Xanthomonas campestris* Are Distinguishable by Restriction Fragment-Length Polymorphism [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1987, 37(3): 214-221.
- [25] 李书光, 赵蕾, 张娜, 等. BOX-PCR 技术在细菌遗传多样性研究中的应用 [J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(8): 228-230.
- [26] CARLOS C, ALEXANDRINO F, STOPPE N C, et al. Use of *Escherichia Coli* BOX-PCR Fingerprints to Identify Sources of Fecal Contamination of Water Bodies in the State of São Paulo, Brazil [J]. *Journal of Environmental Management*, 2012, 93(1): 38-43.
- [27] BAKHSHI B, AFSHARI N, FALLAH F. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)-PCR Analysis as a Reliable Evidence for Suspected *Shigella* SPP. Outbreaks [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2018, 49(3): 529-533.
- [28] 侯霞霞, 王云霞, 胡雪, 等. 肠道细菌基因间重复共有序列-聚合酶链式反应指纹图谱技术用于细菌分型的研究进展 [J]. *乳业科学与技术*, 2019, 42(2): 28-34.
- [29] HUSNI A A A, ISMAIL S I, JAAFAR N M, et al. Current Classification of the *Bacillus Pumilus* Group Species, the Rubber-Pathogenic Bacteria Causing Trunk Bulges Disease in Malaysia as Assessed by MLSA and Multi Rep-PCR Approaches [J]. *Plant Pathology Journal*, 2021, 37(3): 243-257.
- [30] 李秀珍, 彭秀, 谭名照, 等. 重庆市核桃产业发展现状及对策 [J]. *湖北林业科技*, 2014, 43(2): 56-58.
- [31] LANE D J. 16S/23S rRNA Sequencing [J]. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, 1991(1): 125-175.
- [32] VERSALOVIC J, KOEUTH T, LUPSKI J R. Distribution of Repetitive DNA Sequences in Eubacteria and Application to Fingerprinting of Bacterial Genomes [J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(24): 6823-6831.
- [33] VERSALOVIC J, SCHNEIDER M, BRUIJN F J M, et al. Genomic Fingerprint of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction [J]. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 1994, 5: 25-40.
- [34] DAI X H, GAO G, WU M M, et al. Construction and Application of a *Xanthomonas campestris* CGMCC15155 Strain that Produces White Xanthan Gum [J]. *Microbiology Open*, 2019, 8(2): e00631.
- [35] DUTKIEWICZ J, MACKIEWICZ B, LEMIESZEK M K, et al. *Pantoea agglomerans*: A Mysterious Bacterium of Evil and Good. Part II. Deleterious Effects; Dust-Borne Endotoxins and Allergens-Focus on Grain Dust, Other Agricultural Dusts and Wood Dust [J]. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2016, 23(1): 6-29.
- [36] 王绍雪, 马改转, 魏兰芳, 等. 西南地区水稻细菌性条斑病菌致病力的分化 [J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2010, 36(2): 188-191.
- [37] 韩长志, 祝友朋, 王韵晴. 核桃细菌性黑斑病的研究进展 [J]. *林业科学研究*, 2021, 34(4): 184-190.
- [38] 刘维, 刘芳丹, 陆展华, 等. 水稻细条病的发生发展及抗病基因研究进展 [J]. *农学学报*, 2022, 12(10): 15-20.
- [39] 马俊青, 袁国军, 龚东风, 等. 环境因子及栽培措施对核桃细菌性黑斑病的影响 [J]. *湖南农业科学*, 2024(2): 53-59.
- [40] 陈雯雯, 毛雅慧, 李峰. 核桃细菌性黑斑病研究进展 [J]. *湖北林业科技*, 2021, 50(2): 47-53.
- [41] 柴阿丽, 帕提古丽, 郭威涛, 等. 番茄细菌性斑点病菌实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. *园艺学报*, 2019, 46(1): 182-192.
- [42] 程浩, 徐玉凤, 王文晓, 等. 中国硬叶兜兰主要分布区居群表型多样性分析 [J]. *园艺学报*, 2020, 47(6): 1098-1110.
- [43] 聂兴华, 李伊然, 田寿乐, 等. 中国板栗品种(系)DNA 指纹图谱构建及其遗传多样性分析 [J]. *园艺学报*, 2022, 49(11): 2313-2324.
- [44] 郑肖兰, 傅帅, 郑服丛, 等. 植物病原菌抗药性研究进展 [J]. *热带农业科学*, 2011, 31(1): 86-90.
- [45] 刘西莉, 苗建强, 张灿. 植物病原菌抗药性及其抗性治理策略 [J]. *农药学学报*, 2022, 24(5): 921-936.

