

# 陕西关中地区猕猴桃溃疡病菌对 CuSO<sub>4</sub> 的抗性评价

韩 宁,高小宁,陈子璨,王娜娜,秦虎强,黄丽丽\*

(西北农林科技大学 植物保护学院,旱区作物逆境生物学国家重点实验室,陕西 杨陵 712100)

**摘 要:**为明确陕西省猕猴桃细菌性溃疡病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, Psa)对 CuSO<sub>4</sub> 的抗性水平及与 *copA* 和 *copB* 基因表达量的相关性,使用最小抑菌浓度法(MIC)对分离自陕西省关中地区的 84 株 Psa 菌株对于 CuSO<sub>4</sub> 的抗性进行检测。在此基础上,使用实时荧光定量 PCR 方法,对 3 株不同抗性水平 Psa 菌株的基因 *copA* 和 *copB* 与抗铜性的关系进行了分析。结果表明,供试的 84 株 Psa 菌株 MIC 分布在 3.75~6.25 mmol·L<sup>-1</sup> 范围内;不同地区来源的菌株对 CuSO<sub>4</sub> 的抗性表现出明显的差异,其中分离自周至的 Psa 菌株的抗铜水平明显高于眉县。实时荧光定量 PCR 分析结果显示,不同浓度 CuSO<sub>4</sub> 条件诱导下,3 株不同抗性水平的菌株抗铜基因 *copA* 和 *copB* 表达水平与 CuSO<sub>4</sub> 浓度成正相关,且菌株的抗性水平越高,基因 *copA* 和 *copB* 相对表达水平亦越高。陕西省关中地区的 Psa 菌株对 CuSO<sub>4</sub> 表现出较高的抗性水平,且不同地区的 Psa 菌株的抗性表现出明显差异;*copA* 和 *copB* 基因参与了 Psa 菌株对铜离子的适应性反应。

**关键词:**猕猴桃细菌性溃疡病菌;CuSO<sub>4</sub>;抗性水平;抗铜基因;陕西关中地区

**中图分类号:**S663.4      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2020)02-0125-06

## The Evaluation of the Tolerance Level of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* to CuSO<sub>4</sub> in Guanzhong Area of Shaanxi Province

HAN Ning,GAO Xiao-ning,CHEN Zi-can,WANG Na-na,QIN Hu-qiang,HUANG Li-li\*

(College of Plant Protection, Northwest A&F University, State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Yangling 712100, Shaanxi, China)

**Abstract:** In order to determine the tolerance level of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) to CuSO<sub>4</sub> in Shaanxi Province which is the main cultivation area of kiwifruit in China, the tolerance levels of 84 Psa strains to CuSO<sub>4</sub> were detected by using the minimum inhibitory concentration method (MIC). The correlations between the expression levels of *copA*, *copB* genes and the copper resistance of three strains with different tolerance levels were studied by using real-time fluorescent quantitative PCR. The results showed that 84 Psa strains showed highly tolerance to CuSO<sub>4</sub>, and MIC ranged from 3.75 to 6.25 mmol·L<sup>-1</sup>. Significant differences in tolerance levels were observed between the strains collected from different locations. For example, the tolerance levels of the strains collected from Zhouzhi County was significantly higher than those from Meixian County. The real-time PCR results showed that the expression levels of anti-copper genes *copA* and *copB* from three strains with different tolerant levels were positively correlated with the concentration of CuSO<sub>4</sub>, and the higher tolerance level of the strain, the higher relative expression of *copA* and *copB* genes. To sum it up, the Psa strains from Guanzhong showed high tolerance to CuSO<sub>4</sub>, and differences in tolerance levels existed between the strains collected from different locations within the area. In

收稿日期:2019-04-24    修回日期:2019-06-09

基金项目:陕西省重点研发计划项目(2017ZDCXL-NY-03-02;2018TSCXL-NY-01);西北农林科技大学试验示范站(基地)科技成果推广项目(TGZX2018-23)。

作者简介:韩 宁,男,硕士在读,研究方向:植物病害综合治理。E-mail:331156707@qq.com

\*通信作者:黄丽丽,女,教授,博士生导师,研究方向:植物病害综合治理。E-mail:huanglili@nwsuaf.edu.cn

addition, the *copA* and *copB* genes may be involved in the adaptive response of Psa strains to high concentration copper.

**Key words:** *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*; CuSO<sub>4</sub>; resistance level; anti-copper gene; Guanzhong; Shaanxi

猕猴桃(kiwifruit)是重要的果树作物,其风味独特、维生素 C 含量很高、营养价值丰富,有“营养金矿”和“水果之王”的美誉<sup>[1]</sup>。近 10 a,世界猕猴桃产量呈现高速增长趋势,从 108.4 万 t 增加到 180.8 万 t,增长 66.8%。我国猕猴桃产量由 2011 年 110.87 万 t 增长至 2016 年 160.27 万 t<sup>[2]</sup>。陕西省是世界最大的猕猴桃生产基地,其栽植面积和产量均居世界首位,猕猴桃产业已经成为当地农民增收致富的重要保障<sup>[3]</sup>。然而,在猕猴桃产业迅猛发展的同时由丁香假单胞菌猕猴桃致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, Psa)引起的细菌性溃疡病(kiwifruit bacterial canker)已成为猕猴桃的毁灭性病害。该病害最早于 1980 年在日本<sup>[4]</sup>和美国<sup>[5]</sup>发现,随后于 1985 年在中国<sup>[6]</sup>、1988 年在韩国<sup>[7]</sup>、1992 年在意大利<sup>[8]</sup>相继被发现。2008 年以后,该病害不再局限于亚洲和意大利,开始在全世界猕猴桃产区流行。2010 年猕猴桃细菌性溃疡病在法国<sup>[9]</sup>和葡萄牙<sup>[10]</sup>发生,2011 年扩展至西班牙<sup>[11]</sup>和土耳其<sup>[12]</sup>;同时,新西兰(2010)、智利(2010)<sup>[13]</sup>以及阿根廷(2017)<sup>[14]</sup>也发现该病害的暴发。目前,世界上几乎全部猕猴桃栽培区均受到该病害的危害,并在所报道国家造成了严重的产量和经济损失,仅 2008—2009 年 Psa 在意大利的暴发流行就导致了近 200 万欧元的损失<sup>[15]</sup>。由于缺少高抗品种,目前主要依赖农业措施和化学制剂,其中化学制剂主要以铜制剂(如硫酸铜、氢氧化铜、氧化亚铜、噻菌铜等)进行猕猴桃细菌性溃疡病害的防治<sup>[16-17]</sup>。铜制剂对猕猴桃细菌性溃疡病具有良好的防治效果,但随着田间管理过程中化学药剂的长期过量使用,导致了抗性菌株的出现使得防治效果下降<sup>[18]</sup>。

铜制剂是植物细菌病害防治的主要药剂类型,已有研究发现,丁香假单胞菌番茄致病变种(*P. syringae* pv. *tomato*)<sup>[19]</sup>、丁香假单胞菌丁香致病变种(*P. syringae* pv. *syringae*)<sup>[20]</sup>、野油菜黄单胞杆菌疱病致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)<sup>[21-23]</sup>、野油菜黄单胞杆菌核桃致病变种(*X. campestris* pv. *juglandis*)<sup>[24]</sup>等出现了对铜制剂的抗性菌株。日本及韩国学者研究发现了铜制剂产生抗性的 Psa 菌株,并进一步对其抗药性的分子机制进行了深入研究,克隆获得了抗铜基因<sup>[25-26]</sup>。*cop* 操纵子包含 4 个开放阅读框分别命名为 *copA*,

*copB*, *copC* 和 *copD*<sup>[27]</sup>。通过位点特异性诱变产生的突变体和缺失突变体的分析结果表明, *copA* 和 *copB* 对于铜的抗性是必需的<sup>[28]</sup>。有学者分析菊苣假单胞菌(*P. cichorii*)和荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)抗铜菌株的 DNA,发现了这些 *cop* 基因的同源序列。同样的丁香假单胞菌番茄致病变种(*P. syringae* pv. *tomato*)的抗铜菌株的 DNA 也有这些 *cop* 基因的同源序列。表明这些抗铜的同源序列可能是一些假单胞菌所特有的,并且可能有除了抗铜之外的其他功能<sup>[29-31]</sup>。

铜制剂作为防治猕猴桃细菌性溃疡病的主要化学药剂已经在国内应用多年,但一直未见对陕西地区 Psa 菌株对铜制剂抗药性的监测报道。为此,本研究通过测定 84 株采集自陕西省的 Psa 菌株对 CuSO<sub>4</sub> 的抗性水平,以期明确病菌群体对铜离子的敏感性。选取 3 株对 CuSO<sub>4</sub> 抗性水平不同的菌株,通过定量分析抗铜基因 *copA* 和 *copB* 表达量,探究 2 个基因与 Psa 抗铜性的关系。从而为进一步研究 Psa 的抗铜机制奠定基础,同时对生产上铜类药剂的使用具有重要指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

试验所用的 Psa 菌株为 2010—2017 年间采自陕西省猕猴桃主要栽培县(区)周至县、杨陵区、眉县等地的共计 84 个 Psa 菌株。供试菌株由西北农林科技大学植物保护学院黄丽丽教授团队保存,保存条件为-80℃。

### 1.2 培养条件及供试药剂

取保存的供试 Psa 菌株在 LB 平板上划线培养 48 h(25℃);挑取单菌落于 LB 培养液中培养 20~24 h(25℃, 150 r/min);吸取 1 mL 菌液至 2 mL 离心管中,2 000 g 离心 5 min,弃上清,用 200 μL 无菌水悬浮沉淀;测定菌液 OD<sub>600</sub>,并用无菌水稀释至菌液浓度 OD<sub>600</sub> 为 0.1,备用。

用无菌水配置浓度为 312.5 mmol·L<sup>-1</sup> 的 CuSO<sub>4</sub> 母液,用 0.22 μm 孔径过滤器过滤处理,待用。

### 1.3 Psa 菌株对 CuSO<sub>4</sub> 最小抑菌浓度(MIC)的测定

配置 50 ml LB 固体培养基,将配制的 LB 融化,待冷却至 45℃ 左右,将预先配置好的浓度为 312.5 mmol·L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> 母液,加入 LB 中,使培养基中

CuSO<sub>4</sub> 浓度分别达到 1.25、2.5、3.75、5、6.25 mmol · L<sup>-1</sup>,振荡混匀后分别倒平板,并在皿上划分等面积方格区域。用移液器取按 1.2 方法制备的 Psa 菌悬液 5 μL 分别点接到各自对应的方格内,待菌液自然风干后,25℃ 培养,分别于 24、48、72 h 后观察各菌株的生长情况进行记录。各菌株的 MIC 为该菌株不能生长的 CuSO<sub>4</sub> 浓度,即各菌株不能生长的最低 CuSO<sub>4</sub> 浓度为本次试验统计的该菌株的 MIC。每菌株重复 3 皿,试验重复 3 次。

1.4 Psa 抗铜基因表达量分析

选取对 CuSO<sub>4</sub> 抗性差异的 Psa 菌株:m266-4 (MIC 3.75 mmol · L<sup>-1</sup>)、m6 (MIC 5 mmol · L<sup>-1</sup>) 和 m15-03-01 (MIC 6.25 mmol · L<sup>-1</sup>) 进行抗铜基因表达量分析。

1.4.1 细菌 RNA 的提取 配置定量装有 5 mL LB 液体培养基的试管,取 312.5 mmol · L<sup>-1</sup> 的 CuSO<sub>4</sub> 母液加入培养基中,得到 CuSO<sub>4</sub> 终浓度分别为 1.25 mmol · L<sup>-1</sup> 和 3.75 mmol · L<sup>-1</sup> 的液体培养基。

挑单菌落接种至 50 mL LB 培养基,25℃、150 r/min 摇培过夜得种子液 (OD<sub>600</sub> = 0.2) 种子液 2 000 g 离心 15 min,10 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 溶液洗 3 次,调整 OD<sub>600</sub> = 0.5;分别取种子液 5 mL 接种至 200 mL CuSO<sub>4</sub> 浓度分别为 0、1.25、3.75 mmol · L<sup>-1</sup> 的 LB 培养基 (500 mL 三角瓶) 中,25℃、200 r/min 摇培 24 h 后取样用于提取 RNA,每次取 RNA 样时,取菌液 500 μL 菌体,加 1 mL RNA protect\_Bacteria\_Reagent (QIAGEN)。RNA 的提取使用 RNeasy Protect Bacteria Mini kit ( # 74524, QIAGEN),依说明进行操作。

1.4.2 qRT-PCR 使用 RevertAid RT Reverse Transcription Kit ( # K1622, Thermo Scientific) 反转录合成第 1 链。qRT-PCR 使用 UtraSYBR Mixture (Cat # A311-05, GenStar),准备 20 μL 反应体系;在实时荧光定量 PCR 仪 (BioRad, IQ5) 运行。程序为:95℃ - 10 min,40 循环 (95℃ - 15 s、55℃ - 20 s、72℃ - 20 s),95℃ - 10 s,熔点曲线分析 (55℃, 0.5℃/s, 至 95℃)。内参基因使用 *gyrB*,采用 2<sup>(-ΔΔCT)</sup> 法对 *copA* (F: TCGACTGCGCTATGAAA, R: TCGTCTTCGCGTGCATAAT) 和 *copB* (F: GCAACCTACCTACCTGATG, R: TCGACGAGCCGTTGATAAAG) 基因进行相对定量<sup>[32]</sup>。

2 结果与分析

2.1 Psa 菌株对 CuSO<sub>4</sub> 的抗性水平

对分离自陕西省的 Psa 菌株 MIC 的测定结果

进行分析,结果显示 (图 1),供试 Psa 菌株 MIC 分布在 3.75 ~ 6.25 mmol · L<sup>-1</sup>,其中有 48 株的 MIC 为 5 mmol · L<sup>-1</sup> 所占比例为 57%;有 33 株的 MIC 为 6.25 mmol · L<sup>-1</sup>,占比 39%;仅有 3 株的 MIC 为 3.75 mmol · L<sup>-1</sup>,占比 4%。在 Psa 抗铜研究中,当 MIC 超过 0.8 mmol · L<sup>-1</sup> 时则认为菌株为抗性菌株<sup>[33]</sup>。在本试验的供试菌株中,MIC 的最低值为 3.75 mmol · L<sup>-1</sup>,远高于 0.8 mmol · L<sup>-1</sup> 的抗性标准,表明陕西省的 Psa 菌株对 CuSO<sub>4</sub> 有很高的抗性风险。

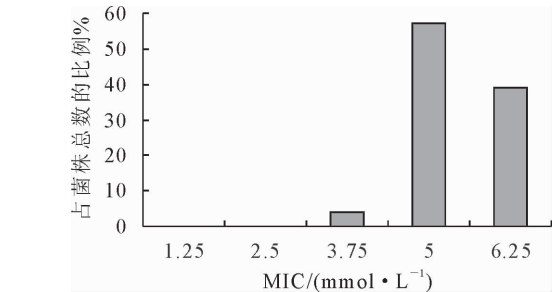


图 1 陕西省猕猴桃溃疡病菌对 CuSO<sub>4</sub> 的 MIC 统计  
Fig.1 MIC statistics to CuSO<sub>4</sub> of Psa strains from Shaanxi Province

2.2 不同地区来源的 Psa 对 CuSO<sub>4</sub> 的抗性

对分离自不同地区来源的 Psa 菌株 MIC 的分析结果如图 2 所示。来自眉县的 Psa 菌株中有 4.7% 的 MIC 为 3.75 mmol · L<sup>-1</sup>,66.7% 的 MIC 为 5 mmol · L<sup>-1</sup>,28.6% 的 MIC 为 6.25 mmol · L<sup>-1</sup>;来自周至的 Psa 菌株中有 8.3% 的 MIC 为 3.75 mmol · L<sup>-1</sup>,41.7% 的 MIC 为 5 mmol · L<sup>-1</sup>,50% 的 MIC 为 6.25 mmol · L<sup>-1</sup>。通过比较发现,不同地区来源的 Psa 菌株的 MIC 分布主要集中在 5 mmol · L<sup>-1</sup> 以上,而分离自周至的 Psa 菌株有 50% 的 MIC 为 6.25 mmol · L<sup>-1</sup>,远高于眉县同水平抗性菌株所占比例。结果表明,分离自不同地区的 Psa 菌株抗铜水平表现出明显差异,其中分离自周至的 Psa 菌株抗铜水平明显高于眉县 Psa 菌株。

2.3 Psa 抗铜基因表达量分析

2.3.1 基因 *copA* 的表达量与对 CuSO<sub>4</sub> 抗性的关系 每个菌株以无 CuSO<sub>4</sub> 条件下基因 *copA* 的表达量为对照,分析在 CuSO<sub>4</sub> 胁迫条件下 *copA* 的表达情况 (图 3)。当 CuSO<sub>4</sub> 浓度为 1.25 mmol · L<sup>-1</sup> 时,*copA* 在菌株 m15-03-01 的相对表达量是对照条件的 5.6 倍,在菌株 m6 和 m266-4 的表达量分别是 1.9 倍和 2.68 倍;当 CuSO<sub>4</sub> 浓度为 3.75 mmol · L<sup>-1</sup> 时,*copA* 在菌株 m15-03-01 的表达量为 6.71 倍,菌株 m6 的表达量为 3.41 倍。上述结果显示,在 CuSO<sub>4</sub> 胁迫条件下,*copA* 表现出上调表达,并且

CuSO<sub>4</sub> 浓度越高,其相对表达量越高。同时,在不同抗性水平的菌株中,基因 *copA* 在抗性水平高的菌株 m15-03-01 的表达量要明显高于菌株 m6 和 m266-4。表明 *copA* 参与了 Psa 对高浓度铜离子的适应性反应。

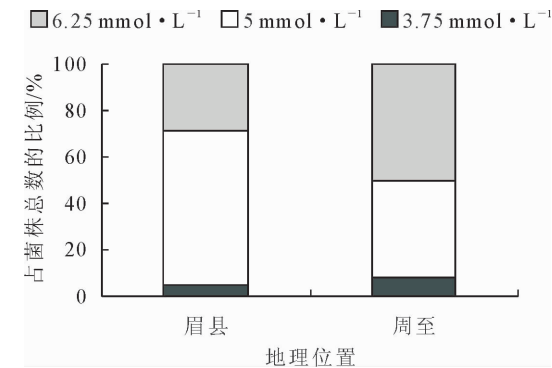


图2 不同地区来源的猕猴桃溃疡病菌对 CuSO<sub>4</sub> 的 MIC 分布情况

Fig. 2 MIC to CuSO<sub>4</sub> distribution of Psa from different area in Shaanxi Province

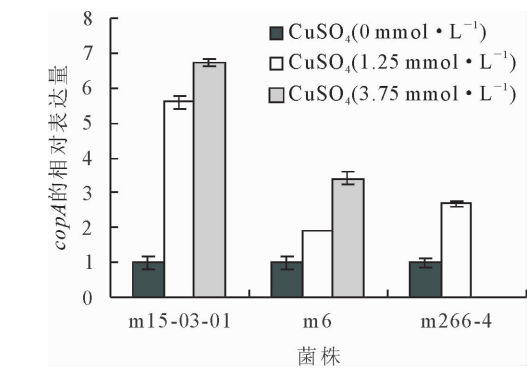


图3 不同 CuSO<sub>4</sub> 浓度处理条件下 Psa 菌株基因 *copA* 的相对表达量

Fig. 3 The *copA* relative expression of Psa strain gene under that the different CuSO<sub>4</sub> concentration treatment conditions

2.3.2 基因 *copB* 的表达量与 CuSO<sub>4</sub> 抗性的关系

由图 4 可知,当 CuSO<sub>4</sub> 浓度为 1.25 mmol · L<sup>-1</sup> 时,*copB* 在菌株 m15-03-01 基因的表达量是对照条件的 8.21 倍,在菌株 m6 和 m266-4 的表达量低于菌株 m15-03-01,分别为 1.25 倍和 2.19 倍;当 CuSO<sub>4</sub> 浓度提高至 3.75 mmol · L<sup>-1</sup> 时,*copB* 在菌株 m15-03-01 的表达量也随之提高至 11.37 倍。不同抗性水平的菌株间的比较显示,*copB* 在高水平抗性菌株 m15-03-01 表达量明显高于略低水平抗性菌株 m6 和 m266-4。上述结果表明,*copB* 也参与了 Psa 对高浓度铜离子的适应性反应,其表达特点与 *copA* 基因相似。

3 结论与讨论

猕猴桃细菌性溃疡病已经成为我国乃至世界猕猴桃栽培区面临的主要防治难题。猕猴桃生产中主

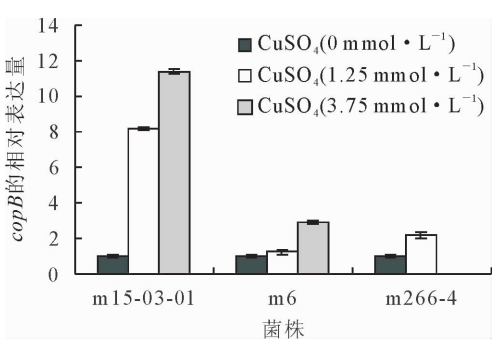


图4 不同 CuSO<sub>4</sub> 浓度处理条件下 Psa 菌株基因 *copB* 的相对表达量

Fig. 4 The *copB* relative expression of Psa strain gene under different CuSO<sub>4</sub> concentrations

要以铜制剂和链霉素防治溃疡病<sup>[4,34]</sup>,链霉素在国内于 2016 年已被禁止生产。使用铜类制剂对猕猴桃细菌性溃疡病进行防治具有成本低、杀菌效果显著、作用时间长等优点。但铜类制剂在猕猴桃细菌性溃疡病的防治过程中被过量使用,导致抗性菌株的产生,使得对溃疡病的防治难度加大<sup>[18]</sup>。

在 Psa 抗铜研究中,当 MIC 超过 0.8 mmol · L<sup>-1</sup> 时则认为其为抗性菌株<sup>[33]</sup>。日本学者将 1984、1987 年和 1988 年从日本猕猴桃园分离的 28 株 Psa 对 CuSO<sub>4</sub> 的抗性进行了测试,结果显示 1984 年分离的所有菌株对铜都是敏感的,CuSO<sub>4</sub> 的最小抑制浓度(MIC)为 0.75 mmol · L<sup>-1</sup>;1987 年和 1988 年分离的一些菌株具有抗性,MIC 范围为 2.25 至 3.0 mmol · L<sup>-1</sup><sup>[25]</sup>。而在本研究中,对陕西省猕猴桃产区采集到的 Psa 菌株采用最小抑菌浓度法测定了其 对铜制剂的抗性水平,测定结果显示,供试的 84 株 Psa 菌株 MIC 分布在 3.75~6.25 mmol · L<sup>-1</sup>,均对 CuSO<sub>4</sub> 表现出了很高的抗性,其中 57% 的菌株 MIC 为 5 mmol · L<sup>-1</sup>;39% 菌株的 MIC 为 6.25 mmol · L<sup>-1</sup>;仅有 4% 的菌株的 MIC 为 3.75 mmol · L<sup>-1</sup>。进一步对分离菌株的地区来源进行分析发现,分离自不同地区的 Psa 菌株对 CuSO<sub>4</sub> 的抗性表现出明显的差异,其中分离自周至的 Psa 菌株的抗铜水平明显高于眉县。对比之前日本学者的相关研究发现本次试验中检测的菌株对铜均具有很高的抗性风险。对此研究在田间使用中应减少铜类制剂的使用,同时注意与不同药剂的轮换交替以及辅配使用,以延缓抗药性的产生。

低浓度的铜是诸多生物所不可获缺的微量元素,但高浓度铜则对细胞具有毒性<sup>[35-36]</sup>。在野油菜黄单胞菌野油菜致病变种(*X. campestris* pv. *campestris*)菌株 Xc17 的 *copA* 基因缺失后,菌株的抗铜能力降低<sup>[37]</sup>。在疮痂黄单胞菌(*X. gardneri*)菌株 Xv10 中的 *copB* 基因也与抗铜性相关<sup>[38]</sup>。在

地毯黄单胞菌柑橘致病变种 (*X. axonopodis* pv. *citri*) 中编码 *copA* 的基因被转座子的插入打断, 导致突变株无法在含有铜的培养基中生长, 即使在测试过的最低 CuSO<sub>4</sub> 浓度 (0.25 mmol · L<sup>-1</sup>) 下也无法生长, 而野生型菌株能够在存在 1 mmol · L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> 的情况下生长<sup>[39]</sup>。此外有研究发现, 丁香假单胞菌猕猴桃致病变种 (*P. syringae* pv. *actinidiae*) 的抗性菌株中至少含有质粒 pPaCu1 和 pPaCu2 中的 1 种, 在耐铜菌株 Pa429 中, 通过 Tn5 插入失活检测了耐铜基因的位置。Tn5 标记获得的铜敏感突变体中硫酸铜的 MIC 从 2.75 mmol · L<sup>-1</sup> 下降到 0.75 mmol · L<sup>-1</sup>, 而分析发现 pPaCuCl 质粒具有与丁香假单胞菌番茄致病变种 (*P. syringae* pv. *toma-to*) 所有 PCR 扩增片段 *copA*、*copB*、*copR*、*copS* 基因杂交的同源区<sup>[25]</sup>。本研究中, 选取了对 CuSO<sub>4</sub> 抗性水平不同的 3 株 Psa 菌株, 通过定量分析抗铜基因 *copA* 和 *copB* 的表达量, 探究 2 种基因与 Psa 对 CuSO<sub>4</sub> 抗性的关系。结果显示对 CuSO<sub>4</sub> 具有不同抗性水平的 3 株 Psa 菌株在 CuSO<sub>4</sub> 胁迫条件下, 基因 *copA* 和 *copB* 均表现出上调表达, 并且 CuSO<sub>4</sub> 浓度越高, 其相对表达量越高; 且抗性水平高的菌株, 基因 *copA* 和 *copB* 的相对表达量亦会相对越高。由此表明 Psa 菌株中的 *copA* 和 *copB* 基因参与了 Psa 对高浓度铜离子的适应性反应。而基因 *copA* 和基因 *copB* 是否还参与了 Psa 中包括毒力在内的其他代谢作用, 还需要做进一步的研究。

参考文献:

[1] 井赵斌, 杨宏勃, 杨玉旺, 等. 秦岭北麓猕猴桃主产区溃疡病原菌的分离与鉴定[J]. 西北林学院学报, 2016, 31(5): 188-193.  
JING Z B, YANG H B, YANG Y W, *et al.* Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Northern area of Qinling Mountains[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2016, 31(5): 188-193. (in Chinese)

[2] 杨红, 伍小雨, 唐江云. 猕猴桃产业现状与发展对策分析[J]. 中国果业信息, 2018, 35(3): 16-19.

[3] 李春游, 赵志博, 高小宁, 等. 陕西关中地区猕猴桃溃疡病菌对链霉素的抗药性监测[J]. 中国果树, 2016(6): 59-62.

[4] SERIZAWA S, ICHIKAWA T, TAKIKAWA Y, *et al.* Occurrence of bacterial canker of kiwifruit in Japan; description of symptoms, isolation of the pathogen and screening of bactericides[J]. Annals of the Phthopathological Society of Japan, 1989, 55: 427-436.

[5] OPGENORTH D C, LAI M, SORRELL M, *et al.* *Pseudomonas* canker of kiwifruit[J]. Plant Disease, 1983, 67: 1283-1284.

[6] 李有忠, 宋晓斌, 张学武. 猕猴桃细菌性溃疡病发生规律研究[J]. 西北林学院学报, 2000, 15(2): 53-56.  
LI Y Z, SONG X B, ZHANG X W. Studies on laws of occur-

rence of bacterial canker in kiwifruit[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2000, 15(2): 53-56. (in Chinese)

[7] KOH J K, CHA B, CHUNG H J, *et al.* Outbreak and spread of bacterial canker in kiwifruit[J]. Korean Journal of Plant Pathology, 1994, 10: 68-72.

[8] SCORTICHINI M. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit in Italy[J]. Plant Pathology, 1994, 43(6): 1035-1038.

[9] DREO T, PIRC M, RAVNIKAR, *et al.* First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit in Slovenia[J]. Plant Disease, 2011, 95(95): 1311.

[10] BALESTRA G M, RENZI M, MAZZAGLIA A. First report of bacterial canker of actinidia deliciosa caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Portugal[J]. New Disease Reports, 2010, 22: 10.

[11] ABELLEIRA A, LOPEZ M M, PENALVER J, *et al.* First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Spain[J]. Plant Disease, 2011, 95(12): 1583.

[12] BASTAS K K, KARAKAYA A. First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Turkey[J]. Plant Disease, 2012, 96(3): 452.

[13] EVERETT, TAYLOR R K, ROMBERG M K, *et al.* First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing kiwifruit bacterial canker in New Zealand[J]. Australasian Plant Disease Notes, 2011, 6(1): 67-71.

[14] BALESTRA G M, BURIANI G. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit pollen from Argentina[J]. Plant Disease, 2017, 102(1): 237.

[15] BALESTRA G M, MAZZAGLIA A, QUATTRUCCI A, *et al.* Current status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy[J]. Australasian Plant Disease Notes, 2009, 4(1): 34-36.

[16] CAMERON, SARJINI. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: chemical control, resistance mechanisms and possible alternatives[J]. Plant Pathology, 2014, 63(1): 1-11.

[17] 秦虎强, 赵志博, 高小宁, 等. 四种杀菌剂防治猕猴桃溃疡病的效果及田间应用技术[J]. 植物保护学报, 2016, 43(2): 321-328.

[18] 高小宁, 赵志博, 黄其玲, 等. 猕猴桃细菌性溃疡病研究进展[J]. 果树学报, 2012, 29(2): 262-268.

[19] BENDER C L, COOKSEY D A. Indigenous plasmids in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; conjugative transfer and role in copper resistance[J]. Journal of Bacteriology, 1986, 165(2): 534.

[20] SUNDIN G W, BENDER C L. Ecological and genetic analysis of copper and streptomycin resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1993, 59(4): 1018-1024.

[21] ADASKAVEG J E, HINE R B. Copper tolerance and zinc sensitivity of mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper[J]. Plant Disease, 1985, 69(69): 61-62.

[22] BENDER C L, MALVICK D K, CONWAY K E, *et al.* Characterization of pXV10A, a copper resistance plasmid in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1990, 56(1): 170.

[23] MARCO G M. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper[J]. Plant Disease, 1983, 67(7): 779-781.

[24] LEE Y A, HENDSON M, PANOPOULOS N J, *et al.* Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*; homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase[J]. Journal of Bacteriology. 1994, 176(1):173.

[25] NAKAJIMA M, GOTO M, HIBI T. Similarity between copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *P. syringae* pv. *tomato*[J]. Journal of General Plant Pathology, 2002, 68(1): 68-74.

[26] HAN H S, NAM H Y, KOH Y J, *et al.* Molecular bases of high-level streptomycin resistance in *Pseudomonas marginlis* and *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*[J]. The Journal of Microbiology, 2003, 41(1): 16-21.

[27] MELLANO M A, COOKSEY D A. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*[J]. Journal of Bacteriology, 1988, 170: 2879-2883.

[28] CHA J S, COOKSEY D A. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins[J]. Proceedings of the National Academy of the Sciences of USA, 1991, 88: 8915-8919.

[29] COOKSEY D A, AZAD H R, CHA J S, *et al.* Copper resistance gene homologs in pathogenic and saprophytic bacterial species from tomato[J]. Applied & environmental microbiology, 1990, 56(2): 431-435.

[30] LIM C K, COOKSEY D A. Characterization of chromosomal homologs of the plasmid-borne copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(14): 4492-4498.

[31] YANG C H, MENGE J A, COOKSEY D A. Role of copper resistance in competitive survival of *Pseudomonas fluorescens* in soil[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1993, 59(2): 580-584.

[32] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101-1108.

[33] PETRICCIONE M, ZAMPELLA L, MASTROBUONI F, *et al.* Occurrence of copper-resistant *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolated from rain and kiwifruit orchards also infected by *P. syringae* pv. *actinidiae*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2017, 149(4): 1-16.

[34] LEE J H, KIM J H, KIM G H, *et al.* Comparative analysis of Korean and Japanese strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker of kiwifruit[J]. The Plant Pathology Journal, 2005, 21(2): 119-216.

[35] GAETKE L M, CHOW C K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients[J]. Toxicology, 2003, 189(1/2): 147-163.

[36] GAGGELLI E, KOZLOWSKI H, VALENSIN D, *et al.* Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis)[J]. Chemical Reviews, 2006, 106(6): 1995-2044.

[37] HSIAO Y M, LIU Y F, LEE P Y, *et al.* Functional characterization of *copA* gene encoding multicopper oxidase in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59: 9290-9302.

[38] 吴亚男. *Xanthomonas gardneri* 抗铜基因 *copB* 的克隆及功能鉴定[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.

[39] ELAINE C T, JULIO C F, MARIA T M, *et al.* The copper resistance operon *copAB* from *Xanthomonas axonopodis* pathovar citri; gene inactivation results in copper sensitivity[J]. Microbiology, 2008, 154, 402-412.

(上接第 118 页)

[9] 王岳坤, 阳江华, 秦云霞, 等. 橡胶树 3 个品系产排胶特性季节变化的比较[J]. 热带作物学报, 2013, 34(1): 81-86.

[10] 王岳坤, 唐朝荣, 秦云霞, 等. 橡胶树 3 种割胶制度的产排胶特性变化比较[J]. 热带作物学报, 2012, 33(7): 1230-1234.

[11] 黄德宝, 秦云霞, 唐朝荣. 橡胶树三个品系(热研 8-79、热研 7-33-97 和 PR107)胶乳生理参数的比较研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2010, 18(2): 170-175.

[12] 高新生, 李维国, 黄华孙, 等. 4 个胶木兼优品系生长量、初产期产量与排胶生理特性[J]. 热带作物学报, 2007, 28(3): 1-4. GAO X S, LI W G, HUANG H S, *et al.* Growth and yield of four latex/timber clones at early production phase and their physiological characteristics[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2007, 28(3): 1-4. (in Chinese)

[13] 杨文凤, 吴明, 校现周, 等. 橡胶树胶木兼优品种热垦 525 生理特性研究[J]. 热带农业科学, 2015, 35(6): 1-4. YANG W F, WU M, XIAO X Z, *et al.* Physiological characteristics of latex/timber rubber clone Reken 525[J]. Tropical Agricultural Science & Technology, 2015, 35(6): 1-4. (in Chinese)

[14] 吴明, 杨文凤, 校现周, 等. 橡胶树胶木兼优品种热垦 523 生理特性研究[J]. 西南农业学报, 2015, 28(3): 1052-1056. WU M, YANG W F, XIAO X Z, *et al.* Physiological characteristics of latex/timber rubber clone Reken 523[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2015, 28(3): 1052-1056. (in Chinese)

[15] 杨湑, 李小琴, 张凤良, 等. 橡胶树云南推广品种胶乳生理分析[J]. 热带农业科技, 2018, 41(4): 1-3. YANG T, LI X Q, ZHANG F L, *et al.* Physiological analysis of latex from promotion varieties of hevea brasiliensis in Yunnan[J]. Tropical Agricultural Science & Technology, 2018, 41(4): 1-3. (in Chinese)