

广东茄科雷尔氏菌 16S rDNA 序列分析

余小漫^{1,2}, 何自福¹, 虞皓¹, 李华平²

(1 广东省农业科学院 植物保护研究所, 广东 广州 510640; 2 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642)

摘要:应用 PCR 方法, 获得了分离自广东番茄、茄子、辣椒、烟草、空心菜、沙姜、姜、马铃薯、花生、菊花、桑树和藿香共 12 种作物 21 个茄科雷尔氏菌菌株的 16S rDNA. 序列测定及比较结果表明, 21 个广东茄科雷尔氏菌菌株 16S rDNA 近全长序列均为 1 528 bp, 序列间同源率 99.2% ~ 100%; 各菌株的 16S rDNA 序列间只有 1 ~ 12 个不等的碱基差异, 其中 20 个菌株的 458 ~ 460 位及 474 位的碱基是 ACT 和 T, 而菌株 HZ-1 则是 TTC 和 A, 说明广东茄科雷尔氏菌的 16S rDNA 序列十分保守. 系统进化分析结果显示, 仅菌株 HZ-1 聚类于茄科雷尔氏菌 2a 亚组中, 其余 20 个菌株均聚类于茄科雷尔氏菌区组 1 中.

关键词:茄科雷尔氏菌; 16S rDNA; 序列分析

中图分类号: Q9681

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)04-0024-05

The Sequence Analysis of 16S rDNA of *Ralstonia solanacearum* from Guangdong

SHE Xiao-man^{1,2}, HE Zi-fu¹, YU Hao¹, LI Hua-ping²

(1 Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

2 College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 16S rRNA genes of twenty - one strains of *Ralstonia solanacearum* were amplified by PCR, which were isolated from *Lycopersicon esculentum*, *Solanum melongana*, *Nicotiana tabacum*, *Capsicum annuum*, *Ipomoea aquatica*, *Kaempferia galangal*, *Zingiber officinale*, *Solanum tuberosum*, *Arachis hypogaea*, *Dendranthema morifolium*, *Morus alba* and *Herba agastaches*, respectively. All of the nearly complete 16S rRNA gene sequences of the strains were determined to be 1 528 bp, and sequence identity of the 16S rDNA ranged from 99.2% to 100%. The number of different base - pair ranged from 1 to 12 bp among 16S rDNA. The specific nucleotides at positions 458 - 460 and 474 of 16S rDNA were ACT and T respectively, except that the isolate HZ - 1 were TTC and A. The results indicated that the 16S rDNA sequences of *R. solanacearum* from Guangdong were highly conserved. Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences showed that HZ - 1 clustered to subdivision 2a, while other 20 isolates clustered to division 1.

Key words: *Ralstonia solanacearum*; 16S rDNA; sequence analysis

茄科雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 是世界上最重要的植物病原细菌之一, 广泛分布于热带、亚热带及温带地区. 该病原细菌的寄主范围很广, 可侵染 55 科数百种植物^[1]. 我国目前已报道有番茄、辣椒、茄子、马铃薯、烟草、花生、生姜、沙姜、桑、空心菜和

桉树等 10 余种作物受到该病原细菌的为害.

该病原细菌种内存在明显的分化. 根据对不同寄主植物种类的致病性不同, 将该病原细菌划分为 5 个生理小种 (Race)^[2-4]; 而根据不同菌株对 3 种二糖和 3 种已醇氧化能力的差异, 可以将其划分为 6 个

收稿日期: 2008-10-16

作者简介: 余小漫 (1981—), 女, 硕士; 通讯作者: 何自福 (1966—), 男, 研究员, 博士, E-mail: hezf@gdppri.com

基金项目: 广东省自然科学基金 (07006209); 广东省科技计划项目 (2006B20301036); 广州市科技计划项目 (2007J1-C0071)

生化变种(Biovar)^[3,5-6]. 另外,一些研究者还依据菌株致病性差异,将其划分为不同致病型^[7-8]. 近年来,一些学者应用不同的分子生物学方法进一步研究了茄科雷尔氏菌,结果显示该病原细菌明显区分为3个地理组,即亚洲组(Asiaticum)、美洲组(Americanum)和非洲亚组(African subdivision)^[9-11]. 因此,目前分类意义上的茄科雷尔氏菌明显是一个复合种.

现代原核生物系统发育研究是基于16S rRNA序列分析,通过对茄科雷尔氏菌16S rDNA的比较分析,有可能了解该病原细菌种内系统进化. Li等^[12]通过对16S rDNA序列分析发现,茄科雷尔氏菌可分为2个簇(或亚种),与Cook等^[9]先前应用RFLP方法将茄科雷尔氏菌分为2个区组(Division)相对应. Taghavi等^[10]根据对19个不同寄主和地理来源的茄科雷尔氏菌菌株16S rDNA序列分析,将区组2分为2a和2b 2个亚组; Poussier等^[11]通过对31个菌株16S rDNA序列分析,进一步将区组2分为2a、2b和2c 3个亚组. Villa等^[13]将68个菌株也聚类为与菌株生化变种相关的4个簇群,并分别对应于上述的区组1、2b、2a和2c. 本文通过对来源于12种寄主植物的茄科雷尔氏菌代表菌株16S rDNA分析,探讨了这些不同寄主来源菌株分子水平的异同,为进一步认识该病原细菌提供参考.

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

供试菌株共21株,分别分离自广东各地不同寄主植物(表1). 所有菌株均在含2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)平板培养基上28℃培养3d. 选取白边宽中间粉红色的单菌落用于试验.

1.2 菌株基因组DNA的提取

按Boucher等^[14]方法提取各菌株基因组DNA.

1.3 PCR引物

16S rDNA的PCR扩增引物为:27f(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和1541r(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'). 上述引物均由上海生物工程技术有限公司合成.

1.4 PCR扩增体系

以提取的基因组DNA为模板进行扩增. PCR反应体系(25 μL)含如下成分:DNA模板约20~25 ng, 10×PCR buffer 2.5 μL, dNTPs 200 μmol/L, 2个引物各0.4 μmol/L和3U Taq酶(TaKaRa). PCR扩增条件为:94℃预变性4 min,之后94℃变性1 min、48℃退火1 min、72℃延伸2 min,30个循环,72℃

最终延伸10 min. PCR反应结束后,取6 μL扩增产物在8 g/L琼脂糖凝胶上电泳,用全自动凝胶成像系统(SYNGENE)观察电泳结果.

表1 供试的21个茄科雷尔氏菌菌株¹⁾

Tab. 1 Twenty-one *Ralstonia solanacearum* strains used in this study

菌株	采样地点	寄主	生化变种	基因库登陆号
ZCZ-2	广州	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	Ⅲ	EF585132
SSF-4	佛山	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	Ⅳ	EF585133
DC-2	东莞	茄子 <i>Solanum melongana</i>	Ⅳ	EF585134
LZ-3	连州	茄子 <i>Solanum melongana</i>	Ⅲ	EF585135
GY-1	高要	辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	Ⅲ	EF585136
GY-2	高要	辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	Ⅲ	EF585137
RR-1	广州	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	Ⅲ	EF585138
RR-2	广州	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	Ⅳ	EF585139
NX-1	南雄	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	Ⅲ	EF585140
NX-5	南雄	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	Ⅲ	EF585141
PY-10	广州	空心菜 <i>Ipomoea aquatica</i>	Ⅳ	EF585142
GY0501	高要	空心菜 <i>Ipomoea aquatica</i>	Ⅳ	EF585143
HZ-1	惠州	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	Ⅱ	EF585144
HZ-2	惠州	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	Ⅲ	EF585145
FC-1-1	广州	菊花 <i>Dendranthema morifolium</i>	Ⅳ	EF585146
CW-1	阳春	姜 <i>Zingiber officinale</i>	Ⅳ	EF585147
CW-10	阳春	姜 <i>Zingiber officinale</i>	Ⅳ	EF585149
YC-5	阳春	沙姜 <i>Kaempferia galangal</i>	Ⅳ	EF585150
YC-33	阳春	沙姜 <i>Kaempferia galangal</i>	Ⅲ	EF585151
PC	阳春	藿香 <i>Herba agastaches</i>	Ⅲ	EF585152
MA	阳春	桑树 <i>Morus alba</i>	Ⅲ	EF585153

1)21个菌株生化变种的确定参考文献[15]

1.5 序列分析

对PCR扩增获得的茄科雷尔氏菌各株菌16S rDNA进行双向测序,并将测定的21个菌株16S rDNA序列,与已登陆GenBank的茄科雷尔氏菌38个菌株、与茄科雷尔氏菌密切相关的Blood disease bacterium(BDB)4个菌株和皮氏假单胞菌(*Pseudomonas syzygii*)2个菌株的16S rDNA序列进行比较分析,应用DNASTAR 5.0软件构建系统发育树.

2 结果与分析

2.1 PCR扩增16S rDNA结果

应用原核生物16S rDNA通用引物27f和1541r分别对21个茄科雷尔氏菌菌株进行PCR扩增,其产物电泳结果显示,从21个菌株基因组DNA中均能成功地扩增出约1530 bp特异片段,与预期片段大小一致(图1).

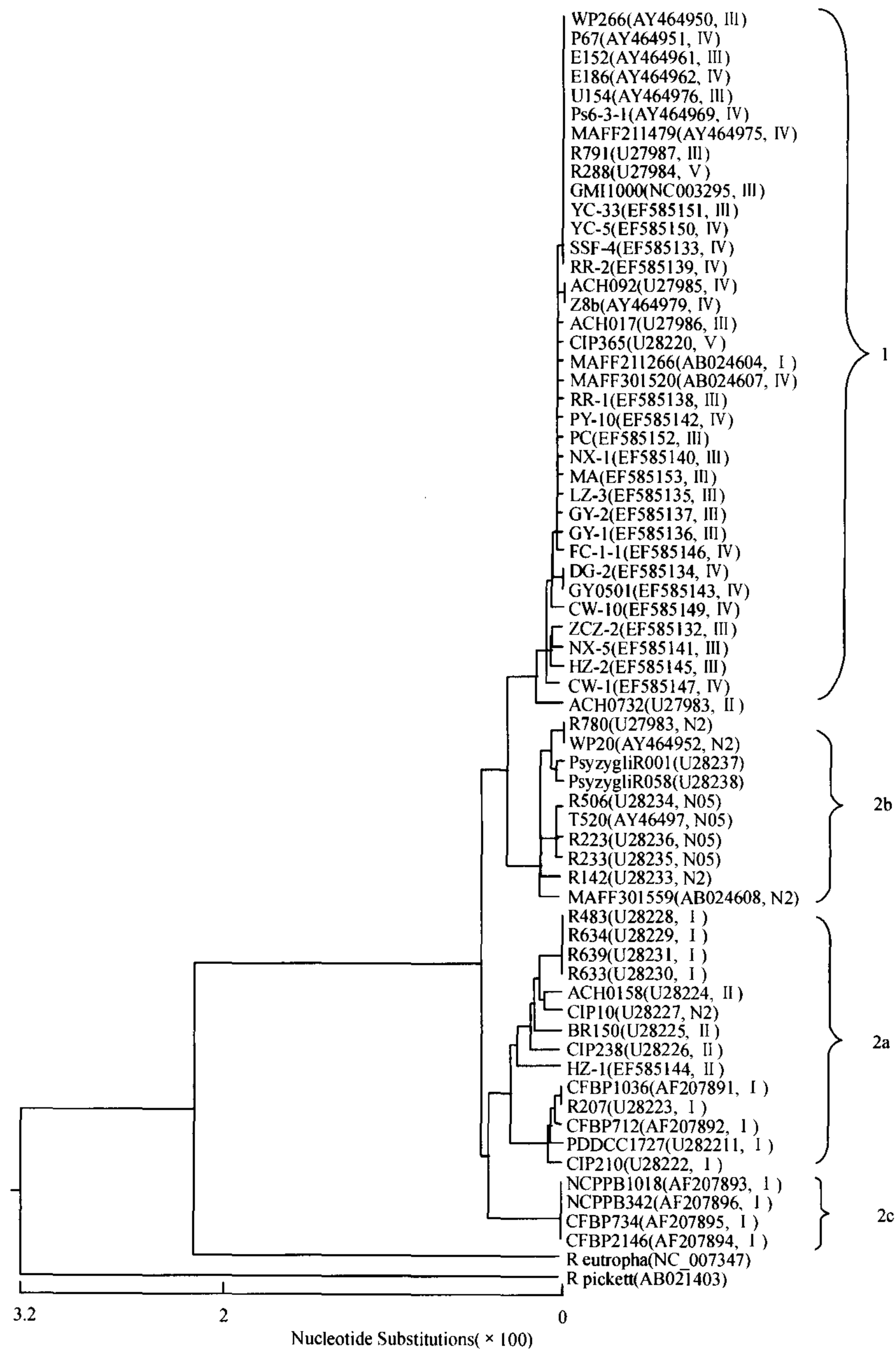


图2 茄科雷尔氏菌及相关菌株的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the tested 21 strains and other 38 strains of *Ralstonia solanacearum*, 4 strains of BDB and 2 strains of *Pseudomonas syzygii*, based on 16S rDNA sequence comparisons

3 讨论与结论

16S rDNA 在细菌种内相当保守,而种间某些区域在一级结构水平上有显著差异^[15]. 16S rDNA 已作为十分重要的分子指标,广泛地应用于细菌遗传特征、鉴定与分类等研究^[16-17]. 茄科雷尔氏菌 16S rDNA 全长为 1 534 bp(GenBank 登录号:NC003295)^[18],虽然该病原细菌是一个复合种,其种内不同寄主或不同地理来源的株系间存在明显分化,但目前的研究结果显示其 16S rDNA 十分保守^[10,12].

Li 等^[12]和 Taghavi 等^[10]等先后利用 PCR 扩增获得该病原细菌不同菌株 16S rDNA 的部分序列,比较结果表明其序列同源率在 99.1% 以上;而 16S rDNA

序列的 458 ~ 460 位点以及 474 位点上的碱基可以作为茄科雷尔氏菌 2 个区组分类的依据,即区组 1 在这几个位点上的碱基是 ACT 和 T,而区组 2 为 TTC 和 A;但区组 1 中 ACH0732 这个非典型菌株例外,其碱基为 TCT 和 G^[10-11]. 本研究也应用 PCR 方法获得 12 种寄主植物来源的 21 株茄科雷尔氏菌 16S rDNA 近全长序列(1 528 bp),除 HZ-1 菌株外,其余 20 个菌株间 16S rDNA 序列间同源率为 99.7% ~ 100% (菌株间序列变异碱基不超过 3 个),而 HZ-1 与其他菌株间 16S rDNA 序列间同源率为 99.2% ~ 99.3% (该菌株与其他菌株间变异碱基 10 ~ 12 个);可见,不同寄主来源的茄科雷尔氏菌菌株的 16S rDNA 序列高度保守. 进一步序列比较结果表明,除 HZ-1 外,其余 20 个菌株(均

聚类于区组1)在458~460位点的碱基为ACT,474位点的碱基为T;而菌株HZ-1(聚类于区组2)在相应位点的碱基分别为TTC和A.因此,本研究结果进一步支持了前人的结论^[10-11].

基于16S rDNA的茄科雷尔氏菌系统发育树可将茄科雷尔氏菌划分为区组1(或亚洲组)和区组2(或美洲组),区组2还可以再分为2a、2b和2c 3个亚组,且上述区组与菌株的生化变种相关,即区组1主要包括生化变种Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ,2a亚组由生化变种I(起源于美洲的)、Ⅱ和N2组成,2b亚组由生化变种N2及BDB菌株组成,2c亚组由来源于非洲南部的生化变种I组成;但ACH0732(生化变种Ⅱ)和MAFF211266(生化变种I)这2个非典型菌株例外,二者均属于区组1^[10-11].本研究21个菌株中,仅菌株HZ-1属生化变种Ⅱ,并聚类在区组2a中,而其余20个菌株分别属生化变种Ⅲ和Ⅳ,且均聚类在区组1中,可见,在菌株生化变种与区组相关性方面,本研究结果与前人^[11]是一致的.但由于目前分离的广东茄科雷尔氏菌主要是生化变种Ⅲ和Ⅳ,关于其他生化变种及其遗传特征等还需要作更进一步的研究.

对于分离自广东惠州马铃薯上的HZ-1菌株,生理生化特性(结果待发表)、16S rDNA序列比较及系统发育分析均表明该菌株与其他菌株存在明显差异,推测该菌株与其他20个菌株的起源不同.由于广东马铃薯种薯均是从北方调运来的,因此关于该菌株的真正起源及与其他菌株间致病性差异等还有待于深入研究.

参考文献:

- [1] HAYWARD A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* [J]. Annual Review Phytopathology, 1991, 29: 65-87.
- [2] BUDDENHGEN I, SEQUERIA L, KELMAN A. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum* [J]. Phytopathology, 1962, 52: 726.
- [3] HE L, SEQUERIA L, KELMAN A. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* [J]. Plant Dis, 1983, 67: 1357-1361.
- [4] PEGG K, MOFFETT M. Host range of the ginger strain of *Pseudomonas solanacearum* in Queensland [J]. Aust J Exp Agric Anim Husb, 1971, 11: 696-698.
- [5] HAYWARD A C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum* [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1964, 27: 265-277.
- [6] HAYWARD A C, EL-NASHAAR H M, NYDEGGER U, et al. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum* [J]. J Appl Bacteriol, 1990, 69: 269-280.
- [7] 陈晓敏, 胡方平, 吴燕榕. 福建省花生青枯病菌致病型及生物型的测定 [J]. 福建农业大学学报, 2000, 29 (4): 470-473.
- [8] 何自福, 虞皓, 罗方芳. 广东茄科青枯菌致病力分化及其DNA多态性分析 [J]. 植物病理学报, 2003, 33 (5): 415-420.
- [9] COOK D, BARLOW E, SEQUERIA L. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms that specify virulence and the hypersensitive response [J]. Molecular Plant - Microbe Interactions, 1989, 2: 113-121.
- [10] TAGHAVI M, HAYWARD A C, LINDSAY I, et al. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the Blood Disease Bacterium of Banana based on 16S rRNA gene sequence [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46: 10-15.
- [11] POUSSIER S, TRIGALET-DEMERY D, VANDEWALLE P, et al. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis and identification of an African subdivision [J]. Microbiology, 2000, 146: 1679-1692.
- [12] LI X, DORSCH M, DEL DOT T, et al. Phylogenetic studies of the rRNA group II *pseudomonads* based on 16S rRNA gene sequences [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1993, 74: 324-329.
- [13] VILLA J E, TSUCHIYA K, HORITA M. Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and other continents based on 16S rDNA, endoglucanase, and *hrpB* gene sequences [J]. J Gen Plant Pathol, 2005, 71 (1): 39-46.
- [14] BOUCHER C A, VAN GIJSEGEM F, BARBERIS P A, et al. *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered [J]. Journal Bacteriology, 1987, 169: 5626-5632.
- [15] 余小漫, 何自福, 李华平, 等. 广东茄科雷尔氏菌菌株生化变种的测定 [C] // 彭友良, 王振中. 中国植物病理学会2008年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008: 337-339.
- [16] CHEN D, ZHANG Q, QIAN K C, et al. Sequence analysis of 16S rRNA gene from 3 microcystis flos-aquae aeruginosa in Guangdong Reservoirs [J]. Ecologic Science, 2006, 25 (1): 41-42.
- [17] 杨雪颖, 张执欣, 杨亚珍, 等. 甘草根瘤菌的16S rDNA全序列测定及系统进化分析 [J]. 西北植物学报, 2006, 26 (4): 707-711.
- [18] SALANOUBAT M, GENIN S, ARTIGUENAVE F, et al. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* [J]. Nature, 2002, 415: 497-502.

【责任编辑 周志红】