

12 种寄主来源的茄科雷尔氏菌 16S-23S rDNA 间隔区序列比较

余小漫^{1,2}, 何自福^{1*}, 李华平², 虞皓¹

(1. 广东省农业科学院植物保护研究所, 广州 510640; 2. 华南农业大学资源环境学院, 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、桑树和藿香等 12 种作物 21 个茄科雷尔氏菌菌株的 16S-23S rDNA 间隔区序列(ITS)。序列分析结果表明, 除 HZ-1 菌株外, 其余 20 个茄科雷尔氏菌菌株 ITS 序列长均为 503 bp, 序列间相似性 99.2%~100%, 序列间差异仅 1~4 bp; 而 HZ-1 菌株的 ITS 序列长为 498 bp, 与其他菌株的 ITS 序列相似性为 95.4%~95.6%。这些结果说明, 这 21 株来源于 12 种不同寄主的茄科雷尔氏菌菌株的 16S-23S rDNA ITS 序列比较保守。系统进化分析显示, 仅菌株 HZ-1 聚类于茄科雷尔氏菌区组 2 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-23S rDNA ITS; 序列分析

中图分类号:S 436. 3 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.0529-1542.2010.01.007

Sequence analysis of 16S-23S rDNA intergenic spacer region of *Ralstonia solanacearum* strains from 12 host plants

She Xiaoman^{1,2}, He Zifu¹, Li Huaping², Yu Hao¹

(1. Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;
2. College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract The 16S-23S rDNA internal transcribed spacer sequences (ITSs) were amplified by PCR from 21 strains of *Ralstonia solanacearum* isolated from tomato, eggplant, tobacco, capsicum, *Ipomoea aquatica*, *Kaempferia galangal*, ginger, potato, peanut, chrysanthemum, *Morus alba* and patchouli in Guangdong Province. The ITSs of 20 among the 21 strains, except the strain HZ-1, were determined to be 503 bp in length, and their sequence similarity ranged from 99.2% to 100%. The ITS of HZ-1 was determined to be 498 bp in length, and the sequence similarity between HZ-1 and the other 20 strains ranged from 95.4% to 95.6%. These results indicated that 16S-23S rDNA ITSs of *R. solanacearum* isolated from 12 host plants were highly conserved. Phylogenetic analysis showed that the strain HZ-1 was clustered in the division 2 of *R. solanacearum*, while the other 20 strains in the division 1 of *R. solanacearum*.

Key words *Ralstonia solanacearum*; 16S-23S rDNA ITS; sequence analysis

茄科雷尔氏菌 [*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*] 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]。在我国, 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危害。

茄科雷尔氏菌种内存在明显生理分化和遗传差异。根据对不同寄主植物种类的致病性不同, 将该病原细菌其划分为 5 个生理小种(race)^[2-4]; 而根据菌株对 3 种二糖和 3 种己醇氧化能力的差异, 又可以将其划分为 6 个生化变种(biovar)^[3,5-6]。Li 等^[7]通过对 16S rRNA 基因序列分析将茄科雷尔氏菌分为 2 个簇(或亚种), 并与 Cook 等^[8]的 2 个区组

收稿日期: 2009-03-08 修订日期: 2009-04-28

基金项目: 广东省自然科学基金(07006209); 省部产学研结合项目(2008B090500212); 广东省国际合作项目(2007A050100005); 广东省

农业攻关(2006B20301036); 广州市科技计划项目(2007J1-C0071)

* 通信作者 Tel: 020-87597476; E-mail: hezf@gdppri.com

(division)相对应。另外,分子系统进化分析还可以将该病原细菌区分为亚洲组(Asiaticum)、美洲组(Americanum)和非洲亚组(African subdivision)等3个地理组^[9-11]。因此,分类意义上的茄科雷尔氏菌明显是一个复合种。

对于茄科雷尔氏菌这个复合种,不同来源,尤其是不同寄主植物来源的菌株间系统进化在分子水平上有无差异?先前的研究结果显示,不同地理区域和寄主植物来源的茄科雷尔氏菌菌株存在丰富的遗传多样性^[12-13],但其16S rDNA十分保守^[14]。在茄科雷尔氏菌的分类与系统进化研究时,16S-23S rDNA ITS序列分析可以作为16S rDNA序列分析的补充^[15]。因此,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的16S-23S rRNA基因间隔区序列的研究,进一步探讨这些不同寄主来源菌株的分子特征,全面认识该病原菌的生理分化和遗传变异,为控制该病原菌的危害奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试菌株共21株,分别分离自广东不同寄主植物,并鉴定其所属生化变种^[16](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3 d。选取白边宽中间粉红色的单菌落用于试验。

表1 供试的21个茄科雷尔氏菌菌株

菌株	采集地	寄主	生化变种	基因库登录号
ZCZ-2	广州	番茄	Ⅲ	FJ744123
SSF-4	佛山	番茄	Ⅳ	FJ744124
DG-2	东莞	茄子	Ⅳ	FJ744125
LZ-3	连州	茄子	Ⅲ	FJ744126
GY-1	高要	辣椒	Ⅲ	FJ744127
GY-2	高要	辣椒	Ⅲ	FJ744128
RR-1	广州	花生	Ⅲ	FJ744129
RR-2	广州	花生	Ⅳ	FJ744145
NX-1	南雄	烟草	Ⅲ	FJ744130
NX-5	南雄	烟草	Ⅲ	FJ744131
PY-10	广州	空心菜	Ⅳ	FJ744132
GY0501	高要	空心菜	Ⅳ	FJ744133
HZ-1	惠州	马铃薯	Ⅱ	FJ744134
HZ-2	惠州	马铃薯	Ⅲ	FJ744135
FC-11	广州	菊花	Ⅳ	FJ744136
CW-1	阳春	姜	Ⅳ	FJ744137
CW-10	阳春	姜	Ⅳ	FJ744138
YC-5	阳春	沙姜	Ⅳ	FJ744139
YC-33	阳春	沙姜	Ⅲ	FJ744140
PC	阳春	藿香	Ⅲ	FJ744141
MA	阳春	桑树	Ⅲ	FJ744142

1.2 菌株基因组DNA的提取

按Boucher等^[17]方法提取各菌株基因组DNA。

1.3 PCR引物

用原核生物16S-23S rDNA ITS通用引物^[18]进行PCR,其序列为:1493f(5'-AGTCGTAACAAGG-TAGCCGT-3')和23r(5'-GTGCCAAGGCATC-CACC-3')。上述引物均由上海生工生物技术工程服务有限公司合成。

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3 U Taq酶(TaKaRa)。PCR扩增条件为:94℃预变性4 min,之后94℃变性30 s,48℃退火30 s,72℃延伸1 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0.8%琼脂糖凝胶上电泳,用全自动凝胶成像系统(SYNGENE公司)观察和分析电泳结果。

1.5 序列分析

对PCR扩增获得的茄科雷尔氏菌21个株菌16S-23S rDNA ITS进行双向测序,以获得各菌株全序列,并将这些序列分别与19个茄科雷尔氏菌菌株、2个blood disease bacterium(BDB)菌株(表2)的16S-23S rDNA ITS进行比较分析,应用DNASTar 5.0软件构建系统发育树。

表2 参与分析的茄科雷尔氏菌和BDB菌株及其16S-23S rDNA ITS序列¹⁾

细菌	菌株	生化变种	基因库登录号
<i>R. solanacearum</i>	R651	I	AJ277768
	R495	I	AJ277850
	R133	I	AJ277848
	R283	I	AJ277777
	R367	I	AJ277849
	R301	I	AJ277769
	R285	I	AJ277852
	NCPPB1331	II	AJ277770
	R309	II	AJ277767
	NCPPB2505	II	AJ277853
	R576	II	AJ277854
	R578	II	AJ277771
	R583	II	AJ277772
	GMI1000	III	NC003295
	R276	III	AJ277856
	R304	III	AJ277773
	R294	IV	AJ277774
	R288	V	AJ277775
	R292	V	AJ277776
BDB	R223	—	AJ277851
	R780	—	AJ277855
<i>R. picketii</i>	MLM005	—	AM501943

1) “—”,表示没有。

2 结果分析

2.1 PCR 扩增 16S-23S rDNA ITS 序列结果

应用原核生物通用引物 23r 和 1 493f 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590 bp特异片段,与预期片段大小一致(图1)。

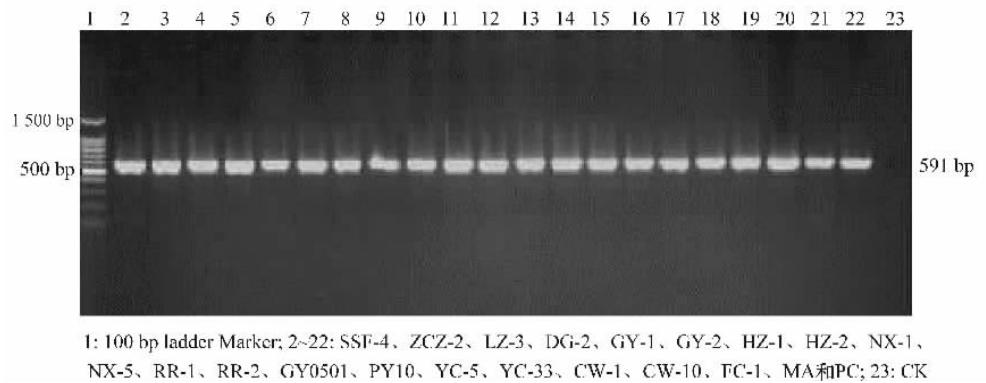


图 1 PCR 扩增 21 个菌株 16S-23S rDNA ITS 的产物电泳结果

2.2 16S-23S rDNA ITS 序列分析结果

对 21 个菌株 PCR 产物进行双向测序, 将测序结果进行拼接, 结果表明: 除菌株 HZ-1 扩增的片段长度为 586 bp (GenBank 登录号: FJ744134) 外, 其他 20 个菌株扩增的片段大小均为 591 bp (GenBank 登录号见图 2)。去除两端 16S rDNA 和 23 rDNA 序列, 菌株 HZ-1 的 ITS 序列长度为 498 bp, 其他 20 个菌株的 ITS 序列全长均为 503 bp。

序列比较结果显示,21个菌株之间ITS序列相似性最高为100%,最低为95.4%;菌株HZ-1与*R. solanacearum* GMI1000的16S-23S rDNA ITS序列相似性为95.8%,而其他20个菌株序列与*R. solanacearum* GMI1000的16S-23S rDNA ITS序列相似性均大于99.2%(表3)。进一步比对发现,菌株HZ-1与其他20个菌株分别有33~37 bp不等的碱基差异;在其余20个菌株中,菌株DG-2,HZ-2,

GY-2、RR-1、RR-2、NX-1、NX-5、PY-10、GY0501 和 FC-1 之间，菌株 GY-1、LZ-3、YC-33、ZCZ-2、MA 和 PC 之间，以及菌株 YC-5、CW-1 和 CW-10 之间，其 ITS 序列均完全一致，其余菌株间也仅有 1~4 个不等的碱基差异。

根据 21 个菌株以及来源于 GenBank 的 22 个菌株(包括 *P. pickettii* 外围菌株)16S-23S rDNA ITS, 利用 DNAstar 软件构建系统发育树, 结果显示: 40 个茄科雷尔氏菌株、2 个 BDB 菌株共 42 个菌株可聚类为 3 个分支, 其中第 1 分支包含了生化变种Ⅲ、Ⅳ 和 V 菌株, 对应于 Li 等^[7]的茄科雷尔氏菌区组 1; 第 2 分支包含了生化变种 I 和 II 菌株, 对应于 Li 等^[7]的茄科雷尔氏菌区组 2; 两个 BDE 菌株自成一个分支。本研究的 21 个菌株中, 只有菌株 HZ-1 聚类在区组 2, 其余 20 个菌株聚类在区组 1(图 2)。

表 3 21 株茄科雷尔氏菌 16S-23S rDNA ITS 的序列相似性比较

续表 3

	ZCZ-2	SSF-4	DG-2	LZ-3	GY-1	GY-2	RR-1	RR-2	NX-1	NX-5	PY-10	GY 0501	HZ-1	HZ-2	PC-1-1	CW-1	CW-10	YC-5	YC-33	PC	MA	GMI 1000	
PY-10												100	95.6	100	100	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100
GY												95.6	100	100	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100
0501																							
HZ-1													95.6	95.6	95.4	95.4	95.4	95.4	95.4	95.4	95.4	95.6	
HZ-2														100	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100
FC-1-1															99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	100	
CW-1															100	100	99.6	99.6	99.6	99.6	99.8		
CW-10																100	99.6	99.6	99.6	99.6	99.8		
YC-5																		99.6	99.6	99.6	99.8		
YC-33																			100	100	99.8		
PC																				100	99.8		
MA																						99.8	
GMI																							
1000																							



图 2 茄科雷尔氏菌及相关菌株的 16S-23S rDNA ITS 系统发育树

3 讨论

16S-23S rDNA ITS序列的进化速度是16S rDNA的10倍^[19],该区间经常有序列的缺失和插入,造成不同种和同种不同菌株的16S-23S rDNA ITS在数目、长度和序列组成上的异质性。因此,在细菌分类、系统进化和分子特征等研究中,16S-23S rDNA ITS序列分析具有重要价值。

本研究分析了来源于12种寄主植物21株茄科雷尔氏菌的16S-23S rDNA ITS全长序列,除菌株HZ-1外,其余20个菌株的序列长均为503 bp,序列间相似性为99.2%~100%;而HZ-1菌株的序列长为498 bp,与其他20个菌株间的序列相似性为95.4%~95.6%。所有菌株ITS序列所包含的tRNA_{Aala}和tRNA_{Aile}核苷酸序列完全一样,高度保守。因此,来源于不同寄主植物的茄科雷尔氏菌菌株间的16S-23S rDNA ITS序列也十分保守。

本研究21个菌株中,仅HZ-1菌株属生化变种Ⅱ,并与已登录GenBank的茄科雷尔氏菌生化变种Ⅰ、Ⅱ菌株聚类在区组2分支中;而其余20个菌株分别属生化变种Ⅲ和Ⅳ,且与已登录GenBank的茄科雷尔氏菌生化变种Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ各菌株聚类在区组1分支中。由此可见,茄科雷尔氏菌的生化变种与区组间存在对应关系。这与对16S rDNA分析结果一致^[16]。茄科雷尔氏菌种内以及一些关系密切的相关菌如blood disease bacterium(BDB)的16S rRNA基因的序列高度相似,有时也难以区分^[8-9]。但利用ITS序列,BDB菌自成一个分支,可以将其与茄科雷尔氏菌分开。

对于分离自广东惠州马铃薯上的茄科雷尔氏菌菌株HZ-1,其16S-23S rDNA ITS与HZ-2及其他茄科雷尔氏菌菌株均存在较大差异,推测该菌株与其他20个菌株的起源不同。16S-23S rDNA ITS系统进化分析也支持这一推测,即HZ-1菌株属于茄科雷尔氏菌区组2,而其他20个菌株均属于茄科雷尔氏菌区组1。但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进一步研究。

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] Buddenhagen I, Sequeira L, Kelman A. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum* [J]. Phytopathology, 1962, 52:726.
- [3] He L Y, Sequeira 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] 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.
- [8] Cook D, Barlow E, Sequeira 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.
- [9] Cook D, Barlow E, Sequeira 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] 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.
- [13] 陈永芳,何礼远,等. 我国植物青枯菌菌株的遗传多样性和群划分[J]. 植物病理学报, 2003, 33(6):503~508.
- [14] 余小漫,何自福,虞皓,等. 广东茄科雷尔氏菌16S rDNA序列分析[J]. 华南农业大学学报, 2009, 30(4):24~28.
- [15] Pastrik K H, Elphinstone J G, Pukall R. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control [J]. European Journal of Plant Pathology, 2002, 108:831~842.
- [16] 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[G]//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.
- [17] 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 of Bacteriology, 1987, 169:5626~5632.
- [18] Li Xiang, De Boer S H. Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* [J]. Phytopathology, 1995, 85:837~842.
- [19] 郑雪松,杨虹,李道棠,等. 基因间隔序列(ITS)在细菌分类鉴定和种群分析中的应用[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(6):678~684.